

Minna Koskenmäki

Variksenmarja luonnollisena elintarvikevärinä

Opinnäytetyö

Kevät 2017

SeAMK Elintarvike ja maatalous

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma



SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU
SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

SEINÄJOEN AMMATTIKORKEAKOULU

Opinnäytetyön tiivistelmä

Koulutusyksikkö: Elintarvike ja maatalous

Tutkinto-ohjelma: Bio- ja elintarviketekniikka

Suuntautumisvaihtoehto: Yleinen elintarviketeknologia

Tekijä: Minna Koskenmäki

Työn nimi: Variksenmarja luonnollisena väriaineena

Ohjaaja: Pekka Maijala

Vuosi: 2017 Sivumäärä: 81 Liitteiden lukumäärä: 1

Tämän opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää elintarviketeollisuuteen soveltuva luonnollinen punainen väriaine mahdollisimman yksinkertaisella metodilla. Väriaineena käytettiin variksenmarjaa, koska siinä on erittäin korkea antosyaanipitoisuus, eikä variksenmarjaa tällä hetkellä hyödynnetä suuresti elintarvikealalla. Variksenmarja on myös terveydelle hyväksi korkean antioksidanttipitoisuutensa takia.

Työssä käytettiin marjamehupohjaisen väriaineen saamiseksi neljää eri metodologiaa. Marjamehua liotettiin kokonaisista marjoista sekä murskatuista marjoista. Lisäksi työssä käytettiin marjamurskan sienifermentointia *Rhizopus oligosporus* - itiöjauheella sekä marjamurskan fermentointia kefiiriseoksella. Kefiirifermentoinnille tehtiin referenssinäyte kiehutetulla kefiiriliemellä. Eri metodeilla saatujen mehupohjaisten väriaineiden stabiilisuutta verrattiin valokokeessa sekä silmämääräistä ja spektreillä näkyvää väriprofiilia verrattiin metodien välillä. Kefiirifermentoinnilla saatu väriaine oli tutkimuksen mukaan stabiilein ja sillä oli voimakkain värjäysteho. Kefiirifermentoinnilla saadulla värillä sekä sen referenssillä värjättiin kivennäisvettä ja tuloksia verrattiin murskatuista ja kokonaisista marjoista liotetulla värillä värjätyn kivennäisveden vastaaviin tuloksiin. Lisäksi verrattiin kefiirifermentoidun väriaineen sekä sen referenssin värjäystehoa kivennäisveteen.

Kirjallisessa osiossa esitetään taustatietoa variksenmarjasta, elintarvikevärien käytöstä sekä tutkimusmenetelmistä. Työssä tarkastellaan myös variksenmarjan terveellisyttä sekä väriainekäytettävyyttä.

Avainsanat: variksenmarja, luonnollinen väriaine, fermentointi, elintarvikeväri

SEINÄJOKI UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Thesis abstract

Faculty: School of Food and Agriculture

Degree programme: Food processing and Biotechnology

Specialisation: General Food Technology

Author: Minna Koskenmäki

Title of thesis: Crowberry as a natural food colourant

Supervisor: Pekka Maijala

Year: 2017 Number of pages: 81 Number of appendices: 1

The aim of this thesis was to develop a natural red food colourant suitable for the food industry with as simple a method as possible. As a base for the colourant crowberry was used since it has very high levels of anthocyanins and it is not properly utilized in the food industry yet. Crowberry is also very healthy because it contains high amounts of antioxidants.

In this work four different methods were used to extract juice as the base colourant. The juice was extracted from crushed and whole berries. Also two different fermentations were used. The first fermentation was *Rhizopus oligosporus* -spore fermented crushed berries and second fermentation was kefir-fermented crushed berries. Also a reference was made for the kefir fermentation by boiling the same amount of the kefir liquid as in the real fermentation. The colourants created by these different methods were then compared by testing their stability in a light exposure test, by looking at the visible colour and colours seen in the colour absorbance spectrums.

The colour gained from the kefir fermentation seemed to be the most stabile and to have the strongest colour. Colour gained from kefir fermentation and the reference was used to colour mineral water and the results were compared to a similar test carried out with colour gained from the extracted crushed and whole berries. In addition, the dye intensity was compared between the kefir fermented colour and the reference colour.

The written part of the thesis sets out the background material about the crowberry, usage of food colourants and research methods. Also the healthiness and colourant accessibility of crowberry is examined.

Keywords: crowberry, natural colourant, fermentation, food colourant

SISÄLTÖ

Opinnäytetyön tiivistelmä.....	2
Thesis abstract.....	3
SISÄLTÖ	4
Kuva-, kuvio- ja taulukkoluettelo	6
Käytetyt termit ja lyhenteet	10
1 JOHDANTO	11
1.1 Värit elintarvikkeissa	12
1.1.1 Miksi värejä käytetään?.....	15
1.2 Värien rakenne.....	15
2 VARIKSENMARJA.....	17
2.1 Terveysvaikutukset ja rakenne.....	18
2.2 Väristä	18
3 TUTKIMUSMENETELMÄT	22
3.1 Stabiiliteetin tutkimuslaitteet.....	22
3.2 Esikäsittelykokeet ja fermentoinnit	23
3.3 Marjojen liuotus tislatussa vedessä.....	25
3.4 Happamuuden vaikutus väriin	26
3.5 Mikrobiseoksella fermentointi	28
3.6 Rhizopus oligosporus fermentointi	33
4 VÄRIN STABIILISUUS.....	37
4.1 Liuotustyö.....	39
4.2 PH-sarja, happamuuden vaikutus väriin.....	45
4.3 Uuden ja vanhan pH-sarjan vertailu	48
4.4 Kefiirifermentointi	53
4.5 Rhizopus oligosporus fermentointi	60
4.6 Kivennäisvesisovellus	63
4.6.1 Kivennäisveden värjäys liotusmenetelmällä saaduilla väreillä	64
4.6.2 Kivennäisveden värjäys kefiiri- ja referenssi väriaineilla	66
4.6.3 Kefiirinäytteestä ja referenssistä saadun värin voimakkuuden vertailu	69

5 JOHTOPÄÄTÖKSET	72
5.1 Yhteenveto	72
5.2 Tulosten arviointi	72
5.3 Kiinnostavat ja suositeltavat lisätutkimukset	74
6 Virhearviot ja -menetelmät	76
LÄHTEET	78
LIITTEET	81

Kuva-, kuvio- ja taulukkoluetelo

Kuva 1. Työssä käytetty spektrofotometri.	23
Kuva 2. pH-säädetyt värinäytteet kuukauden säilytyksen jälkeen.....	24
Kuva 3. Kokonaiset marjat vedessä.....	25
Kuva 4. Murskatut marjat vedessä.....	26
Kuva 5.(1) pH 2,8 (2) pH 3,8. Ylärivissä vanha näyte, alarivissä uusi.....	27
Kuva 6. Ylärivissä vanhat pH näytteet, alarivissä uudet.....	27
Kuva 7. Etanolin mittaaminen Vernier-laitteistolla.	28
Kuva 8. Näytteet valmiina fermentointiin. Edessä referenssit, takana kefiirinäytteet.	30
Kuva 9. Kefiirinäyte 1 ennen soodan lisäystä.	31
Kuva 10. Kefiiri-marjamurska soodan lisäyksen jälkeen.	31
Kuva 11. Suodatus Büchner-suppilolla.	32
Kuva 12. Rhizopus oligosporus kaura-marjaseoksessa kaksi päivää fermentoituneena.	34
Kuva 13. Näyte RO1 suodatuksen jälkeen.	35
Kuva 14. Rhizopus oligosporus -itiöjauhe kokonaisessa kaurassa ja marjamurskassa ennen fermentointia.	35
Kuva 15. Valokokeessa käytetty lamppu sekä kefiirinäytteet minisentrifugiputkissa.	37
Kuva 16. Näytteet valolle altistettuna.	38
Kuva 17. Näytteet M1-M3 sekä K1-K3 ennen valokoetta.....	40

Kuva 18. Näytteiden silmämääräiset värit. Näytteet kyveteissä vasemmalta katsottuna M1-M3 ja K1-K3.	40
Kuva 19. Yläpuolella vanhan pH-sarjan näytteet, alla uudet näytteet.	49
Kuva 20. kohdassa 1–3 referenssit ja 4–6 kefiirinäytteet ennen valokokeen alkua.	54
Kuva 21. Kefiirinäyte kyvetissä.	55
Kuva 22. RO-näytteet kyveteissä.	63
Kuva 23. Työssä käytetyn kivennäisveden sisällysluettelo.	63
Kuva 24. Kivennäisveden värjäys lietetuista marjoista saaduilla väreillä. Vasemmalla VM, oikealla VK näyte.	64
Kuva 25. Vasemmalla kefiirifermentoinnilla saadulla väriaineella värjättyä kivennäisvettä, oikealla referenssi väriaineella värjättyä kivennäisvettä.	66
Kuva 26. Referenssi- ja kefiirinäytteet viiden kuukauden pimeäsäilytyksen jälkeen.	69
Kuva 27. Referenssin ja fermentoidun väriaineen vertailu. Vasemmalla puolella on referenssinäytteellä värjätty näyte ja oikealla fermentoidulla kefiirinäytteellä värjätty näyte.	70
Kuvio 1. Antosyaanin tavallinen rakenne (Hendry 1996, 14).	20
Kuvio 2. Puskuriliuoksen laskut.....	23
Kuvio 3. Kokonaisen marjan sekä murskatun marjan spektrit Vernier-laitteistolla ennen valokoetta.....	39
Kuvio 4. Näytteiden M1-3 sekä K1-3 absorbanssi muutokset valokokeen aikana.	41
Kuvio 5. M1-M3 sekä K1-K3 näytteiden absorbanssi muutokset aallonpituudella 520 valokokeen aikana. 0-50 minuuttia.....	41

Kuvio 6. M1–M3 näytteet ennen valokoetta ja valokokeen jälkeen.	42
Kuvio 7. K1–K3 näytteiden spektrit ennen valokoetta ja valokokeen jälkeen.	44
Kuvio 8. Mitatut absorbanssit valokokeen aikana.	45
Kuvio 9. Uusien pH näytteiden pH _{2,8–4,5} spektrit ennen valokoetta ja valokokeen jälkeen.	46
Kuvio 10. Uusien pH-näytteiden pH _{5,1–6,0} spektrit ennen valokoetta ja valokokeen jälkeen.	47
Kuvio 11. Absorbanssin muutosarvot valokokeen aikana pH näytteillä 2,8–4,5. ..	49
Kuvio 12. Uusien ja vanhojen pH-sarjojen absorbanssimuutokset valokokeen aikana.	50
Kuvio 13. pH _{3,8} uuden ja vanhan näytteen absorbanssimuutosta kuvaava kuvaaja.	51
Kuvio 14. pH _{4,5} uuden ja vanhan näytteen absorbanssimuutosta kuvaava kuvaaja.	51
Kuvio 15. pH _{5,1} uuden ja vanhan näytteen absorbanssimuutosta kuvaava kuvaaja.	52
Kuvio 16. pH _{6,0} uuden ja vanhan näytteen absorbanssimuutosta kuvaava kuvaaja.	52
Kuvio 17. Kefiiri- ja referenssinäytteiden spektrit ennen valokoetta.	54
Kuvio 18. Absorbanssimuutokset näytteissä valokokeen aikana.	56
Kuvio 19. Referenssi- ja kefiirinäytteiden absorbanssimuutokset valokokeen aikana.	57
Kuvio 20. Kefiirinäytteiden K1–K3 spektrit ennen valokoetta sekä valokokeen jälkeen.	58

Kuvio 21. Referenssien (R1–R3) spektrit ennen valokoetta ja valokokeen jälkeen.	59
Kuvio 22. Itiöfermentoinnin absorbanssi-arvot valokokeen aikana.....	60
Kuvio 23. RO-näytteet ennen valokoetta.....	61
Kuvio 24. RO-näytteiden absorbanssin muutokset valokokeen aikana eri aallonpituuksilla.....	62
Kuvio 25. Valokokeen aikainen absorbanssimuutos VM-näytteissä.....	64
Kuvio 26. Valokokeen aikainen absorbanssimuutos VK-näytteissä.	65
Kuvio 27. Kefiirinäytteillä värjätyyn kivennäisveden absorbanssi-arvoja valokokeen aikana.	67
Kuvio 28. Referenssinäytteellä värjätyyn kivennäisveden absorbanssi-arvoja valokokeen aikana.	67
Kuvio 29. Referenssi ja kefiirinäytteiden värjäystehon vertailuspektrit.	71
Taulukko 1. Yleisesti käytettyjä luonnollisia punaisia elintarvikevärejä.	14
Taulukko 2. Eräiden antosyaanien väri ja absorptiomaksimi aallonpituuksilla (Hendry 1996, 14).....	21
Taulukko 3. Kefiirinäytteisiin lisätyt soodan määrät ja näytteiden pH ennen fermentointia.	29
Taulukko 4. Mehunsaanto suodatuksessa, kefiirinäyte sekä referenssit.....	32
Taulukko 5. Näytteiden 1–6 pH:t pH-sarja työssä.	45
Taulukko 6. Kivennäisveren värjäys vertailussa kivennäisveteen lisätty väriaine määrät.....	70

Käytetyt termit ja lyhenteet

Flavonoidi	Kasvien aineenvaihdunnan tuotteita, joita esiintyy kasvien maanpäällisissä osissa kuten hedelmissä ja marjoissa antaen niille ominaisen värin.
Absorbanssi	Absorbanssilukema on suoraa verrannollinen aineen pitoisuuteen, mitä enemmän näyte absorboi valoa, sitä suurempi on näytteen absorbanssi.
Fermentointi	Fermentointi, eli käymisreaktio, jonka valmistusprosessi perustuu mikrobikasvuun. Fermentointi muuttaa elintarvikkeen rakennetta ja makua sekä parantaa säilyvyyttä.
pH	Suure jolla ilmoitetaan liuoksen happamuutta.
Kefiiri	Bakteereista ja hiivoista koostuva bakteeriviljelmä.
Antosyaani	Kasvipigmenttejä jotka aikaansaavat muun muassa kasvien ja vihannesten punaiset, violetit ja siniset värisävyt.
Synteettinen väriaine	Luonnossa esiintymättömiä väriaineita, joita tuotetaan kemiallisen synteessin kautta. Esimerkiksi tartratsiini.
Luonnollinen väriaine	Orgaanisia väriyhdisteitä jotka saadaan luonnosta syömäkelpoisista lähteistä, normaaleilla ruuanlaittomenetelmillä. Esimerkiksi antosyaanit ovat luonnollisia väriaineita joita saadaan punaisista marjoista ja hedelmistä.

1 JOHDANTO

Työn tavoitteena oli vastata elintarvikealalla olevaan kysyntään punaisesta väriaineesta. Varsinkin mehu- ja virvokejuoma-alalla värille olisi tarvetta. Tähän tarpeeseen oli helppo liittää mahdollisuus saada variksenmarjalle käyttöarvoa elintarvikealalla, kun tällä hetkellä variksenmarja ei ole paljolti käytetty. Ainoastaan murto-osa Suomessa kasvavista marjoista hyödynnetään Suomessa (Puupponen-Pimiä 2016, 3).

Variksenmarja valikoitui työhön myös sen terveyttä edistävien vaikutusten vuoksi. Uudessa tutkimuksessa (Jurikova 2016) on tutkittu vähemmän käytettyjen marjojen terveysvaikutuksia ja todettu, että variksenmarja on terveellisempi marja kuin on uskottu. Tutkimuksessa todetaan variksenmarjan kokonaisantioksidantti pitoisuuden olevan jopa mustikkaa suurempi ja variksenmarjan mainitaan olevan eräs johtavista superfood ruoka-aineista.

Työn aihe on erittäin ajankohtainen ja aiheeseen liittyviä tutkimuksia julkaistiin runsaasti 2016 vuoden lopulla sekä 2017 alussa. Esimerkiksi Food Technology -lehden numerossa 11/16 oli useamman sivun artikkeli luonnollisista väriaineista.

Variksenmarjaa ei makuprofiilinsa vuoksi ole käytetty marjavalmistamisessa, mutta väriaineeksi siitä olisi korkean antosyaanipitoisuutensa vuoksi. Työssä etsittiin mahdollisimman yksinkertaista menetelmää variksenmarjan antosyaanien saamiseksi värjäyskäyttöön, sekä vertailtiin erilaisia menetelmiä värin saantoon, mahdollisimman yksinkertaisella menetelmällä pitäen variksenmarjan luonnollisessa muodossaan. Menetelminä oli kokonaisen marjan liotus vedessä, murskatun marjan liotus vedessä sekä kaksi erilaista fermentointia; kefiiri-fermentointi sekä *Rhizopus oligosporus* -sienifermentointi.

Jurikova (2016) esittää tutkimuksensa alkupuheessa, raa'an variksenmarjan epämieluisan maun johtuvan runsaasta tanniinipitoisuudesta marjassa, sekä että variksenmarjan makuprofiili on parempi pakastuksen jälkeen. Elintarvikekäytössä makuprofiilia parantavat myös erilaiset käsittelyt, kuten mehuksi tai hilloksi keittäminen sekä muiden marjojen kanssa sekoittaminen (Laaksonen 2010).

1.1 Värit elintarvikkeissa

Värin vaikutusta elintarvikkeiden kiinnostavuuteen on tutkittu laajalti. Aiheesta on tehty useita kuluttajatutkimuksia, myös Ilkan mielipide osastolla kirjoittava Turun yliopiston jatko-opiskelija Paakki (2014) pohtii värien vaikutusta elintarvikkeisiin. Paakki huomioi tekstissään värien vaikutusta ruuan ennako-odotuksiin, kuten värin vaikutusta oletettuun makuun. Ruokamieltymykset ja värioletukset ovat Paakin mukaan opittuja, sillä vastasyntyneillä on todettu vain mieltymyksiä makeisiin ruokiin, muttei väreihin liittyviä mieltymyksiä.

Ruuan ulkonäkö ja väri saavat kuluttajan tekemään ennakkopäätelmiä ruuan mausta ja laadusta. Kun elintarvikkeen väri ja maku ovat yhtenevät, on useimmiten myös maku tunnistettavissa. Jos taas maku ja väri eivät täsmää, niin tuotteen maku harvemmin tunnistetaan. Tuotteen väri vaikuttaa myös kuluttajan mielikuvaan tuotteen makeudesta, varsinkin limonadi- ja mehutuotteissa. (Hendry 1996, 40.)

Elintarvikkeessa käytettävä väriaine tulee valita tarkasti, jotta saadaan aikaiseksi oikea värisävy. Antosyaanien käyttöä väriaineena tuotteessa tulee harkita tuotteen ominaisuuksien mukaan. Käyttöä tulee harkita varsinkin tuotteissa joissa on runsaasti proteiineja tai tanniineja, sillä ne voivat heikentää antosyaanien tehoa. Lisäksi värin valintaan vaikuttavat usein tuotteessa oleva vapaan veden määrä, pH, tuotteen prosessointi (mm. lämpötilat, käsittelyt), tarvittava säilyvyys ja varastointi olosuhteet. (Hendry 1996, 44–45.) Antosyaanit harvemmin soveltuvat juomateollisuudessa sameisiin väreihin, sillä sameutta aiheuttavat ainesosat usein aiheuttavat myös antosyaanien sinertymistä. (Hendry, 55) Entsyymikäsittelyn taas on huomattu tuhoavan antosyaaneja joissain tapauksissa, kirjoittaa Hendry (s.57) viitaten Jiangin (1990, 596–600) tutkimukseen.

Elintarvikkeissa eniten käytettyjä punaisia väriaineita saadaan tummista viinirypäleistä, värisävyt vaihtelevat punaisesta sävystä aina sinertävän punaiseen väriin. Viinirypäleet ovat suurin kaupallinen antosyaanien lähde. Viinirypäleistä

saatavat antosyaanit ovat taloudellisesti kannattavia, sillä viinirypäleen kuoret ovat suuri sivuvirta viinin tuotannosta. (Hendry 1996, 53.) Myös punajuuresta (*Beta vulgaris*) saadaan voimakas punainen väriaine betaniini, joka ei kuitenkaan kestä kovin hyvin valoa, kuumennusta eikä rikkioksidia. Betaniini kuuluu betasyaneeihin, eikä siis ole antosyaani. Kasveissa joissa esiintyy betaniinia, ei esiinny antosyaaneja. Punajuuresta saatu väriaine on stabiilein pH 4,5:ssä. Sen väri ei muutu huomattavasti pH muutoksessa pH 4–pH 7. Sen väri kuitenkin muuttuu huomattavasti sinisenpään sävyyn happamissa olosuhteissa. (Hendry, 59–63.)

Punaista väriainetta on myös pitkään uutettu punaisista *Coccus cacti* -kirvoista. Tämä väri on tunnettu nimellä karmiini ja se on ollut pitkään hyvin yleinen punaisen värin lähde elintarviketeollisuudessa. Karmiinin käyttöominaisuudet ovat erittäin hyvät ja väri kestää erinomaisesti happea, valoa, rikkioksidia, kuumennusta sekä aktiivista vettä. Karmiini on kuitenkin parhaimmillaan korkeammissa pH-arvoissa, ja väri haalistuu matalissa arvoissa, esimerkiksi pH 3:ssa karmiinin vahva punainen väri haalistuu oranssiin vivahtavaksi. Kasvipörräiset antosyaanin lähteet, kuten esimerkiksi työssä tutkittu variksenmarja, taas ovat usein parhaimmillaan matalissa pH-arvoissa. (Hendry 1996, 64–67.)

Punakaalimehukonsentraatti on myös antosyaaneihin perustuva väriainesovellus, joka on hyvin kuumennusta ja valoa kestävä (Hendry 1996, 55). Myös variksenmarjan osalta näitä ominaisuuksia olisi hyvä tutkia, jotta saataisiin tarkempi profiili mahdollisista käyttökohteista. Ominaisuuksien tutkimus elintarviketäyttöön suunnitelluille väriaineille on tärkeää teollisuuskäytössä. Esimerkkinä punakaalimehukonsentraatin säilyvyyttä tutkittaessa huomattiin, että kun punakaalista saatua väriainetta lisättiin askorbiinihapollisiin juomiin, värin säilyvyys huononi huomattavasti. Vain 50% alkuperäisestä väristä säilyi kolmen viikon varastoinnissa (Francis 1999, 110).

Viineissä on kokeiltu mustaviinimarjan ja variksenmarjan mehusekoituksia paremman värin saannon takia. Viineissä, joissa on käytetty sekoitemehuja, on ollut korkeampi antioksidanttiaktiivisuus, kuin pelkästään mustaviinimarjoista tehdyissä viineissä. (Heinonen 1998) Tutkimuksissa on myös todettu, että variksenmarjamehua lisäämällä viiniin, saatiin parannettua viinin väriä huomattavasti. Jurikova (2016) kirjoittaa työssään tutkimuksista (Eiro 2000; 2002 ;

Rein 2004), joissa todettiin viinin värin olevan 35% voimakkaampi variksenmarjamehua lisättäessä verrattuna pelkkään mustaherukoista tehtyyn mehuun. Variksenmarjoista ja mustaviinimarjoista tehdyn viinin värin intensiivisyys laski kuitenkin noin 60% kuuden kuukauden varastoinnissa.

Taulukossa 1 esitetään yleisimmin käytettyjä luonnollisia väriaineita sekä niiden käyttökohteita. Käyttökohteet on tässä työssä Eviran mukaisia sallittuja käyttökohteita Suomessa.

Taulukko 1. Yleisesti käytettyjä luonnollisia punaisia elintarvikevärejä.

Väriaine	pääominaisuudet	käyttökohteet
Punajuuriväri (E162)	Ei kestä hyvin valoa, kuumennusta eikä rikkioksidia. Ei enimmäismäärärajoituksia. Paras stabiliteetti pH 4,5:ssä.	Voidaan käyttää juomissa, jälkiruuissa, jäätelöissä, hilloissa, makeisissa, kahvileivissä, keitoissa ja kastikkeissa. (Evira)
Antosyaani (E 163)	Puna-sininen väriaine, saadaan tummien rypäleiden sekä mustien viinimarjojen kuorista uuttamalla.	Suurin kaupallinen antosyaanien lähde. Käytetään juomissa, jälkiruuissa, jäätelössä, hillossa, makeisissa ja kahvileivissä. (Evira)
Karmiini (E120)	Kestää erinomaisesti happea, valoa, rikkioksidia, kuumennusta sekä aktiivista vettä. Parhaimmillaan korkeassa pH:ssa. Karmiinin käytössä on enimmäismäärä rajoituksia.	Erittäin yleinen väri elintarvikkeissa. Saadaan käyttää mm. sulatejuustoissa, punaisissa hedelmäsäilykkeissä, hilloissa, hedelmänmakuisissa muroissa, makkarassa sekä savustetussa kalassa. (Evira)
Punakaalimehukonsentraatti	Hyvin kuumennusta ja valoa kestävä. Ei sovellu askorbiinihapollisiin juomiin.	Antosyaaneille epätyypillisesti käyttökohteena meijerituotteet, kuten mm. jäätelöt, sillä soveltuu korkeamman pH-arvon tuotteisiin.

1.1.1 Miksi värejä käytetään?

Elintarvikkeita värjätään, jotta tuotteen ulkonäkö vastaisi kuluttajan odotuksia tuotteesta. Värejä elintarvikkeisiin lisätään useimmiten seuraavista syistä; vahvistamaan tuotteen luonnollisia värejä, jotka eivät tuotteessa alun perin ole niin vahvoja kuin kuluttaja olettaa, esimerkiksi liian haalea väri hedelmä- tai marjasoseessa. Väriaineita käytetään myös vahvistamaan värien yhdenmukaisuutta tuotteen eri osissa, palauttamaan luonnollisen värin, joka on prosessoinnin vaikutuksesta haalistunut tai antamaan värittömille tuotteille, kuten juomille tai makeisille, tuotteeseen sopivan värin. (Hendry 1996, 40-41.)

Juomateollisuus kattaa suurimmat markkinat niin luonnollisille- kuin synteettisille väriaineille. Aikaisemmin juomateollisuudessa on käytetty enimmäkseen synteettisiä väriaineita luonnollisten väriaineiden ollessa liian epästabiileja ja kalliita. Luonnollisten väriaineiden kysyntä on kuitenkin kasvanut myös juomateollisuudessa, joten uusille applikaatioille luonnollisten väriaineiden käyttöön on tarvetta, varsinkin uudenaikaiset mehua sisältävät virvokejuomat ovat nostaneet kysyntää luonnollisille väriaineille. (Francis 1999, 107.)

Luonnollisten väriaineiden käytössä eri käyttökohteet vaativat erilaisen väriaineen. Tietty luonnolliset väriaineet eivät säily nestemäisissä tuotteissa. Erityyppisille tuotteille onkin usein testattu erilaisia käyttökohteita. Nestemäisiin tuotteisiin sopimattomat väriaineet voivat usein sopia tuotteisiin joissa on matalampi aktiivisen veden määrä, kuten jäädykkeisiin ja hedelmäpitoisiin täytteisiin esimerkiksi leivonnaisissa. (Francis 1999, 107-110.) Huonosti säilytystä kestäviä värejä voidaan käyttää esimerkiksi konditorioissa, joissa tuotteet päätyvät kulutukseen saman päivän aikana.

1.2 Värien rakenne

Jotta ymmärretään kuinka värit elintarvikkeissa toimivat, tulee hieman tuntee värien kemiaa. Orgaanisissa väriaineissa on kromoforeiksi nimetty atomiryhmä, joka antaa molekyylille värin. Mikäli molekyylissä ei kromoforia esiinny, on yhdiste väritön. Värilliset orgaaniset yhdisteet näkyvät värillisinä kun ne absorboivat valoa

näkyvän valon alueella eli aallonpituuksilla 380nm–780nm. Väriaineen molekyylien absorbointiaallonpituus määrittää minkä värisenä väri näkyy ihmissilmään. Mikäli molekyylit absorboivat valoa aallonpituuksilla 435–480nm, joka vastaa sinistä väriä, näkyy se ihmissilmään keltaisena värinä. Mikäli molekyylissä on useampia delokalisoituneita erillisiä elektronisysteemejä, voi molekyyli absorboida valoa useilla aallonpituuksilla. (Sirkiä 2013, 4-6.) Tässä työssä tehtyjen tutkimusten tuloksissa oli spektri kuvaajia joissa oli useita erikokoisia huippuja, joiden voidaan olettaa tämän teorian mukaan olevan eri värien muodostamia valon absorbointihuippuja.

Sirkiä (2013, 5-10) kirjoittaa myös, että joidenkin molekyylien substituentit, eli hiilivetyketjussa vetyatomin korvaavat atomit, saavat aikaan muutoksia yhdisteen värissä tai väri-intensiteetissä. Tällaisia kemiallisia ryhmiä ovat muun muassa hydroksyyli ryhmät, aminoryhmät, karboksyyli ryhmät, eetteriryhmät sekä halogeenit. Sirkiä myös mainitsee antosyaanien väriin vaikuttavan antosyaaniin sitoutuneet ryhmät. Mikäli fenolisien hydroksyyli ryhmien määrä kasvaa antosyaanin B-renkaassa, muuttuu yhdisteen väri punaisesta siniseen, Sirkiä kirjoittaa.

2 VARIKSENMARJA

Variksenmarja on 10-30cm korkea ainavihanta varpu. Lehdet ovat neulasmaiset ja marja on kiiltävän musta mehevä luumarja jonka sisällä on 6-9 punaruskeaa siementä. Variksenmarja kasvaa pohjoisella pallonpuoliskolla, niin Euraasiassa kuin Pohjois-Amerikassa. Variksenmarjasta Suomessa esiintyy kahta lajiketta, etelänvariksenmarjaa sekä pohjoisenvariksenmarjaa. Pohjanvariksenmarja on pohjoisemmassa esiintyvä lajike, jonka marjat ovat suurempia ja mehevämpiä kuin etelänvariksenmarja. Marjojen satokausi on heinäkuulta lumentuloon asti, parhaat sadot Suomessa saadaan Pohjois-Suomessa, Pohjanmaalla ja Pohjois-Karjalassa. Variksenmarjat viihtyvät kuivissa ja kuivahkoissa oloissa kangasmetsissä ja karuilla rämeillä. (Piippo 2010, 177.)

Marjan kasvuympäristöllä näyttäisi olevan vaikutusta variksenmarjan polyfenolien, varsinkin flavonoidien, pitoisuuteen, sillä pitoisuudet vaihtelivat huomattavasti eri ilmastoissa ja kasvupaikoissa. Variksenmarjassa on paljon antosyaanipigmenttejä kuoressa, ja marja soveltuu hyvin luonnolliseksi väriaineeksi sekä lisäaineeksi. (Jurikova 2016.)

Variksenmarjaa ei ole hyödynnetty elintarviketeollisuudessa lähes ollenkaan, marjanjalostustehtaat ostavat variksenmarjaa mustikan jatkeeksi huonoina mustikkavuosina ja variksenmarjasta tehdään myös marmeladia (Piippo 2010, 178) sekä glögiä. 1990-luvulla variksenmarjasta yritettiin kehittää menestystuotetta ja uusia reseptejä kehitettiin (Piippo, 178). Variksenmarjaa käytetään lääketeollisuudessa sekä kosmetiikassa. (Puupponen-Pimiä 2016) Variksenmarjalle soveltuvia käyttökohteita elintarvikealalla voisi olla marjojen käyttö kuivattuna tai jauhettuna terveysvaikutteisissa elintarvikkeissa, myös lääketeollisuudessa on variksenmarjalle soveltuvia käyttökohteita. (Jurikova 2016)

2.1 Terveysvaikutukset ja rakenne.

Variksenmarjassa on runsaasti eri fenoleita kuten antosyanidiineja, flavonoleja sekä fenolihappoja. Antosyaanien koostumus on monipuolinen ja pohjoisen marjoissa on lisäksi hydroksikanelihappoa. (Piippo 2010, 178).

Variksenmarjan kokonaisantioksidanttipitoisuuden on tutkittu olevan korkeampi kuin luonnonmustikalla. Terveysvaikutteisen marjasta tekee varsinkin sen korkea polyfenolipitoisuus ja varsin runsaasti marjassa on flavonoleja, kuten kversetiiniä, keferolia ja myrisetiiniä. Variksenmarjalla on tutkittu olevan myös tulehdusta ehkäisevä vaikutus sekä antidiabeettinen vaikutus, sillä variksenmarja voi hidastaa hiilihydraattien pilkkoutumista. (Törrönen 2012) Variksenmarjasta tehdyllä uutteella on myös onnistuttu torjumaan joitain haitallisia bakteereja, jotka voivat aiheuttaa muun muassa ruokamyrkytyksiä sekä infektioita. Tutkimuksessa on myös huomattu syöpää ehkäiseviä vaikutuksia. (Skrovankova 2015) Variksenmarjan ainesosien kerrotaan suojaavan soluja UVB-säteilyltä ja estävän solukuolemia. (Kim 2011; 2013)

Antioksidanttisuudella tarkoitetaan marjan antioksidanttipitoisuutta. Korkean antioksidanttipitoisuuden uskotaan olevan terveydelle hyväksi. Antioksidantti on kemiallinen yhdiste, joka alentaa ja tasoittaa oksidatiivisen stressin aiheuttamia haittavaikutuksia ja on elimistön terveenä säilymiselle välttämätön. Antioksidantit myös suojaavat vapaiden radikaalien aiheuttamilta vahingoilta. Uuden tutkimuksen mukaan variksenmarja olisi yksi vahvimista antioksidanttimarjoista. (Skrovankova 2015)

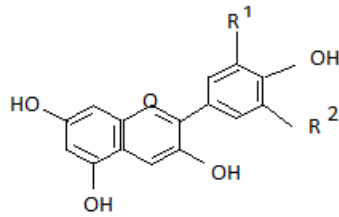
2.2 Väristä

Flavonoidit ovat tutkitusti maailman värikkäimpiä yhdisteitä. Flavonoidit antavat hedelmille ja vihanneksille niiden värin. Flavonoideja esiintyy kaikissa kasveissa ja teollisuudessa eniten käytettyjä flavonoideja ovat antosyaanit. Flavonoidien

jälkeen suurimman joukon pigmenttejä löytää erilaisista sienistä, joista onkin löytynyt yli tuhansia pigmenttejä, mutta flavonoideja sienissä ei ole tutkitusti havaittu. (Hendry 1996, 30.)

Luonnollisten väriaineiden suurena haasteena on niiden huono värinpitävyys. Värin stabiilisuus on haasteellista taata, sillä värin säilyvyyteen vaikuttavat erilaiset tekniset ominaisuudet, kuten tuotteen altistuminen valolle ja lämmölle sekä tuotteen pH muutokset sekä värin vuorovaikutus lopputuotteen muiden ainesosien kanssa. Antosyaaneista saatava väri on stabiileimmillaan matalassa pH:ssa. (Francis 1999, 108) Lisäksi värin stabiilisuuteen vaikuttavia asioita ovat mm. pakkaus, eli kuinka paljon tuotteeseen pääsee happea ja valoa. Hapen on huomattu aiheuttavan antosyaanien yhdisteissä reaktioita, jotka nostavan pH:ta, jolloin värin stabiiliteetti heikkenee sillä antosyaanit ovat herkkiä pH muutoksille. Elintarvikkeissa käytettävien värien valinnassa on otettava huomioon stabiliteettiin vaikuttavat ominaisuudet. Myös lopputuotteen prosessointi vaikuttaa värin valintaan, sillä esimerkiksi lämpökäsittelyt voivat muuttaa joitain väriyhdisteitä, joten pitää varmistaa että lämpökäsittelyn jälkeenkin väri on halutunlainen. (Hendry 1996, 55–56, 260.)

Antosyaanit ovat kaikkein värikkäimpiä flavonoideja. Ne esiintyvät useimmiten punaisen tai sinisen sävyinä, ja ovat vesiliukoisia väriaineita. Flavonoidit ovat rakenteellisesti trisyklinen fenyylibentsopyraani, joka koostuu kahdesta bentseenirenkaasta (kuvio 1). Antosyaani on luultavasti aina kiinnittyneenä yhteen tai useampaan sokerimolekyylisiin, useimmiten β -D glukoosin tai β -D galaktoosin kanssa. Mikäli antosyaanin B-rengas joutuu kosketuksiin tiettyjen metallien, kuten raudan tai alumiinin, tai muut antosyaanin osat magnesiumin kanssa, aiheuttaa se pigmentin sinertymisen. Antosyaanin ja flavonoidin vuorovaikutuksessa väri voi taas muuttua hyvinkin monenlaiseen variaatioon. Flavonoidipolymeerit ovatkin hyvin tyypillisiä ja joissain tapauksissa haluttuja väriyhdisteitä. (Hendry 1996, 13-14.)



Kuvio 1. Antosyaanin tavallinen rakenne (Hendry 1996, 14).

Antosyaanit toimivat pH-indikaattorien tavoin. Värisävy muuttuu punaisesta punasiniseen, violettiin, siniseen sekä vihreästä keltaiseen pH:n kasvun mukaan pH 1:stä aina pH 13:ta asti. Yleisesti antosyaaneja käytetään vain happamissa tuotteissa, joissa pH pysyy alle 4. Myös värin intensiivisyys muuttuu pH:n mukana, väri intensiivisyyden ollessa vahvimmillaan pH1:ssä. Intensiivisyys kuitenkin laskee nopeasti pH:n noustessa. Nämä huomioid on tehty tutkimuksissa joissa käytettiin viinirypäleen kuorista tehtyä väriainetta. (Hendry 1996, 56.)

Luonnolliset väriaineet ovat värisävyltään huomattavasti syvempiä kuin useimmiten käytetyt synteettiset väriaineet. Luonnollisissa väriaineissa väri sävyn saaminen tietyntyyliseksi on kuitenkin haastavampaa kuin synteettisissä väriaineissa. Esimerkiksi väriaineeksi käytettävissä marjamehuissa voi olla useita eri antosyaaneja, joiden pitoisuuksista riippuen värin sävy muuttuu. Usein antosyaaneista saatavia mehustepohjaisia väriaineita pyritään saamaan oikean sävyisiksi, tutkimalla antosyaanin lähteen kaikki vaikuttavat antosyaanit ja laskemalla absorbanssi per gramma-kaavalla oikea määrä väriaineita. (Hendry 1996, 44–46.)

Taulukko 2. Eräiden antosyaanien väri ja absorptiomaksimi aallonpituuksilla (Hendry 1996, 14).

Name ▼	Colour ▼	λ_{max} in acidic ▼
		methanol
Cyanidin	Blue-red	535
Delphinidin	Purple-blue	546
Malvidin	Purple	542
Pelargonidin	Scarlet-red	520
Peonidin	Blue-red	532
Petunidin	Purple-blue	543

Taulukossa 2 nähdään eräiden antosyaanien väri sekä värin absorptiomaksimi aallonpituusalue. Pelargonidiini on punaisena esiintyvä antosyaani ja sen absorptiomaksimi näkyy aallonpituudella 520 (Hendry 1996, 14). Tämän tiedon perusteella työssä valittiin tutkittavaksi aallonpituudeksi 520nm.

Antosyaanien stabiilisuutta on tutkittu luonnollisten väriaineiden yleistyessä. Eri antosyaaneilla on erilainen stabiiliteetti, ja ne reagoivat eri tavoin muun muassa valoon ja lämpökäsittelyihin. Antosyaanista riippuen säilyvyys oli Kallion (1986) tutkimuksen mukaan 4–6 viikkoa käsittelemättömässä mehussa. Kaikkein stabiilimmaksi antosyaaniksi tutkimuksessa osoittautui delfiniidiinin galaktosidit ja vähiten stabiiliksi osoittautuivat petunidiini, peonidiini sekä syanidiini. Kallio kirjoittaa tutkimuksessaan variksenmarjamehun antosyaanien värien säilymisajaksi vain muutaman viikon. Syitä miettiessä Kallio toteaa huomionarvoisiksi asioiksi asyloimattomat, monosiidiset sekä matala metoksyyliset koostumukset antosyaanissa. Kallio myös mainitsee erotettujen antosyaanien säilyvyyden happea sisältävissä mehuissa olevan kuukaudesta puoleentoista kuukauteen, kun taas tyypirikkaissa säilytysolosuhteissa säilyvyysaika lähes kolminkertaistui. Askorbiinihapon Kallio mainitsee huonontavan antosyaanien säilyvyyttä ja askorbiinihapon on huomattu muuttavan antosyaanien väriä ruskean sävyisiksi.

3 TUTKIMUSMENETELMÄT

Työssä etsittiin mahdollisimman yksinkertaista metodia saada variksenmarjasta teollisuuskäyttöön soveltuva luonnollinen väriaine. Teollisuudessa käytetyt väriaineet voivat olla muun muassa kuivattuja väriaineita, mehkonsentraatteja tai mehusteita (Hendry 1996, 57). Työssä tutkitut väriaineet olivat mehustepohjaisia.

Työssä tehtiin myös pienimuotoinen stabiiliteettikoe, jolla saadaan hieman avattua värien stabiiliteettiä valokokeessa. Väreillä tehtiin myös sovellutus, jossa eri väriaineilla värjättiin kivennäisvettä. Väriaineen lämmönkestävyyttä tai makuvaikutusta tuotteeseen ei tutkittu.

Työssä tutkittiin eri metodeilla saatujen väriaineiden absorbanssimuutoksia valokokeen eri vaiheissa, sekä kivennäisvesisovelluksessa pimeäsäilönnän ja valosäilönnän eroa. Absorbanssimuutosta tutkittiin aallonpituudella 520, sillä Hendry (1996, 14) kirjoittaa punaisena näkyvän antosyaanin absorbaatiomaksimi aallonpituusalueen olevan tällä aallonpituudella.

Työssä päätettiin tutkia kahta erityyppistä fermentointia, sillä Puupponen-Pimiä (2016, 21) mainitsee työssään että marjojen fermentoinnin hyötyjä ovat voimakkaampi aromi sekä väri. Fermentoinnin käytöstä väriteollisuudessa ei löytynyt julkaisuja, joten fermentointi menetelmä johdettiin Viljasen (2014, 149) tutkimuksessa käytetystä fermentointimallista.

3.1 Stabiiliteetin tutkimuslaitteet

Työssä käytettiin UV/VIS-spektrofotometriä, jonka toiminnassa hyödynnetään sähkömagneettisen säteilyn ja tutkittavan aineen välistä vuorovaikutusta. Sähkömagneettinen säteily on aaltoliikettä ja sen aallonpituusalue on hyvin laaja. Ultra-violetti säteilyn (UV) ja näkyvän valon (VIS) spektrin alue on aallonpituudella 190-1000nm. UV/VIS-spektri syntyy vain kun tutkittavassa näytteessä on molekyylejä, jotka sisältävät kromoforin, eli väriä tuottavan rakenneosan (Mattila 2001, 61).



Kuva 1. Työssä käytetty spektrofotometri.

Spektrofotometri säteilyttää kyvetissä olevaa näytettä aallonpituudella 520 ja näytteen läpi mennyt säteilyn (valon) määrä mitataan valodetektorilla, jolloin signaali on suoraan verrannollinen valointensiteettiin. Kuvassa 1 nähdään työssä käytetty spektrofotometri, sekä asetettu aallonpituus 520nm.

3.2 Esikäsittelykokeet ja fermentoinnit

Esikokeena tehtiin vertailusarja missä 0,1M sitruunahappopuskuriliuoksilla säädettiin variksenmarjasta puristetun mehun pH halutulle arvolle ja otettiin näytteistä absorbanssiarvot spektrofotometrillä. Työtä varten valmistettiin puskuriliuokset, joihin punnittavat sitruunahappo- ja sitraattimäärät näkyvät kuviossa 2.

$$\begin{array}{ll} \text{0,1M} & \\ \text{citric acid} & C = \frac{m}{V} \quad m = 0,1 \times 210,14 \times 0,2 \text{ L} \\ & = 2,2028 \text{g sitruunahappoa} \end{array}$$

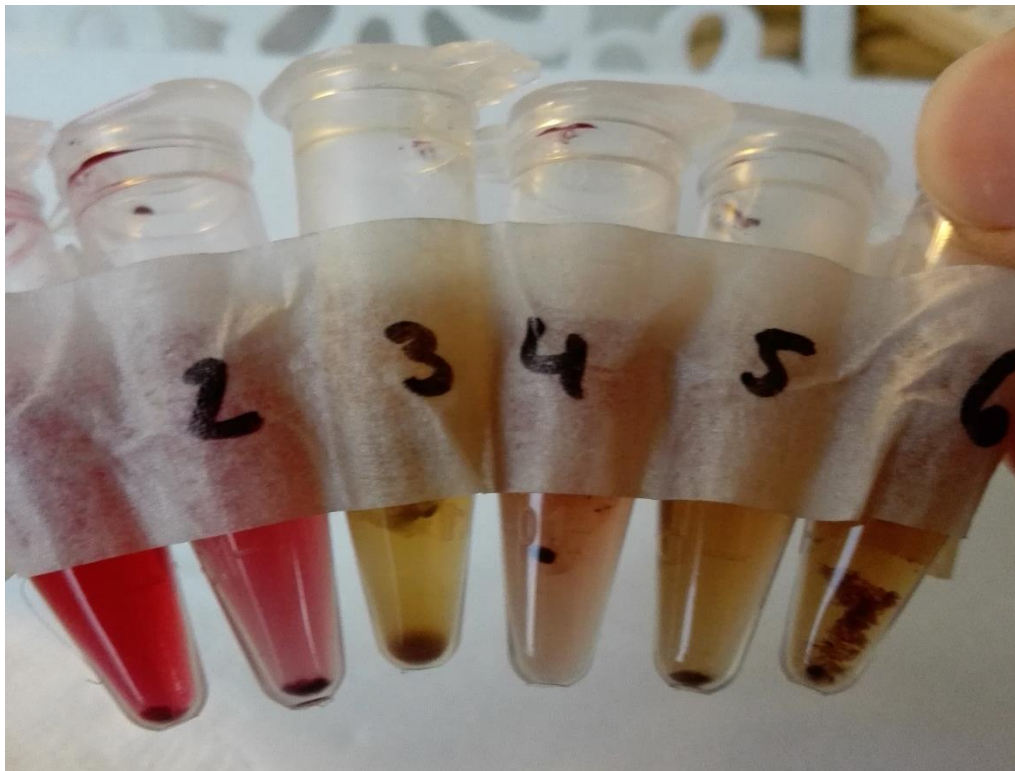
$$\begin{array}{ll} \text{0,1M} & \\ \text{Na}_3\text{citrate} & C = \frac{m}{V} \quad 0,1 \text{ mol/L} \times 294,12 \text{ g/mol} \times 0,2 \text{ L} \\ & = 5,8824 \text{g sitraattia} \end{array}$$

Kuvio 2. Puskuriliuoksen laskut.

Sitruunahappoa ja sitraattia lisättiin pH-sarjan ohjeen mukaan, niin että saatiin kuuden puskuriliuoksen sarja, joissa puskuriliuosten pH-arvot olivat pH 3–pH 6.

Puskuriliuosten valmistuksen jälkeen pH-mittari kalibroitiin ja puskuriliuosten pH-arvot tarkistettiin. Esikäsittelytyössä tehtiin variksenmarjamehusta pH-sarja, jossa lisättiin 0,9ml puskuriliuosta ja 0,1ml variksenmarjamehua. Näytteistä saatiin pH 3–pH 6:n mukainen sarja. Näytteet laitettiin sentrifugiin 13 000rpm viideksi minuutiksi, jotta näytteissä oleva mahdollinen sakka saatiin minisentrifugiputken pohjalle, jotta Vernier-laitteistolla saadaan näytteistä spektrit.

Näytteet säilytettiin minisentrifugiputkissa kuukauden ajan valoisassa keittiössä. Joulukuulla päivä on lyhyehkö, mutta keinovaloa näytteet ovat vähintäänkin saaneet. Näytteistä huomattiin silmämääräisesti (kuva 2 alla) että näytteet 1 ja 2 ovat säilyttäneet parhaiten värinsä. Näytteet 5 ja 6 kellertyivät jo parissa päivässä ja ovat sen jälkeen pysytelleetkin kellertävän ja tai rusehtavan värisinä. Yllättäen näyte 3 kellastui ennen näyte 4:sta. Olisi kuvitellut värin muuttumisen seuraavan pH:n mukaisesti, mutta näyte 4 pysyi silmämääräisesti enemmän punertavana kuin näyte 3.



Kuva 2. pH-säädetyt värinäytteet kuukauden säilytyksen jälkeen.

Töissä pyrittiin vertailemaan eri metodeja toisiinsa tai vähintään vertailua varten valmistettuun referenssiin.

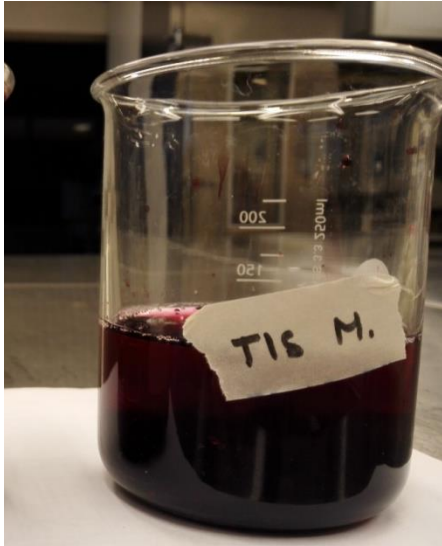
3.3 Marjojen liuotus tislatussa vedessä

Työssä verrattiin kokonaisten ja murskattujen marjojen vesiliuotusta. Yhteen dekantterilasiin laitettiin 100ml tislattua vettä ja 20g kokonaisia marjoja. Toiseen samanlaiseen dekantterilasiin laitettiin 100ml tislattua vettä ja 20g murskattuja marjoja.



Kuva 3. Kokonaiset marjat vedessä.

Kokonaisten marjojen vertailukohteena käytettiin samalla tavalla vedessä liuotettuja murskattuja marjoja.



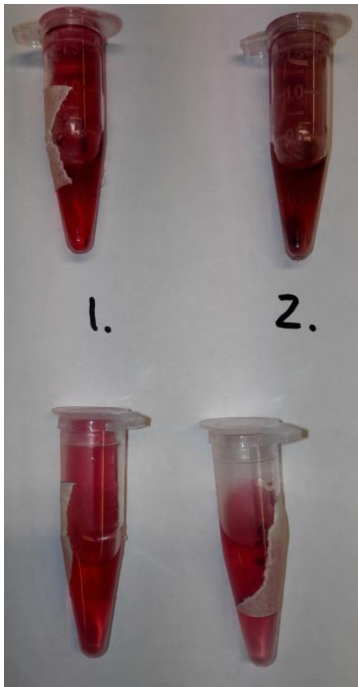
Kuva 4. Murskatut marjat vedessä

Marjoja liotettiin vedessä yön yli huoneenlämmössä. Marjat sulatettiin vesihauteessa ja murskatut marjat murskattiin huhmarella, niin että marjojen kuori rikkoontui. Yllä olevat kuvat 3 ja 4 on otettu aamulla jolloin marjat ovat olleet yön yli likoontumassa. Dekantterilasit olivat foliolla peitettynä, ettei valo pääsisi vaikuttamaan näytteisiin.

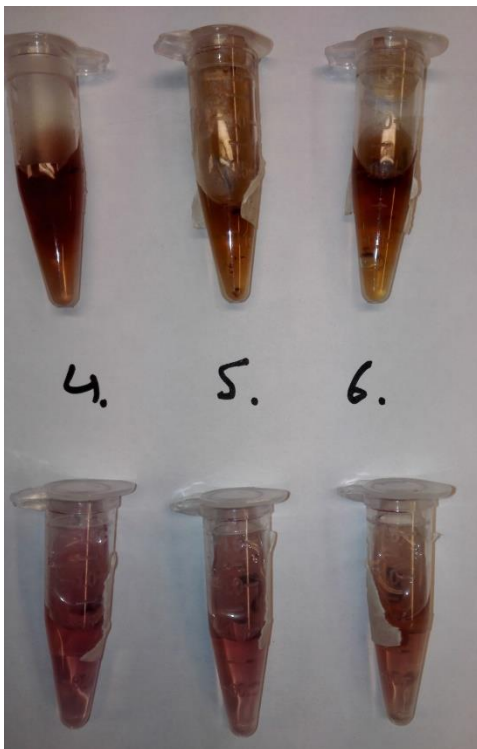
Kokonaisesta ja murskatusta marjasta saadut liuotetut väriaineet pipetoitiin minisentrifugiputkiin, niin että marjamehua tuli 100 mikrolitraa ja tislattua vettä 900 mikrolitraa. Liuoksesta tuli täten melko laimea. Murskatusta marjasta saadut näytteet nimettiin M1–M3. Kokonaisesta marjasta saadut näytteet taas nimettiin K1–K3. Näytteiden pH oli 3,6.

3.4 Happamuuden vaikutus väriin

Työssä tehtiin esikoetta myötäilevä uusi vertailutyö. Vanhan verrokin mukaisesti työssä käytettiin samoja puskuriliuoksia, jotta pH-arvot ovat samat kuin ensimmäisessä erässä. Marjamurskan pH oli 3,5 ja työssä käytetyt puskuriliuokset olivat 2,8; 3,8; 4,5; 5,1; 5,5; 6,0. Laitettiin minisentrifugiputkiin 100 mikrolitraa marjamehua ja 900 mikrolitraa puskuriliuosta. Näytteet käytettiin sentrifugissa, 13000rpm viiden minuutin ajan.



Kuva 5.(1) pH 2,8 (2) pH 3,8. Ylärivissä vanha näyte, alarivissä uusi.



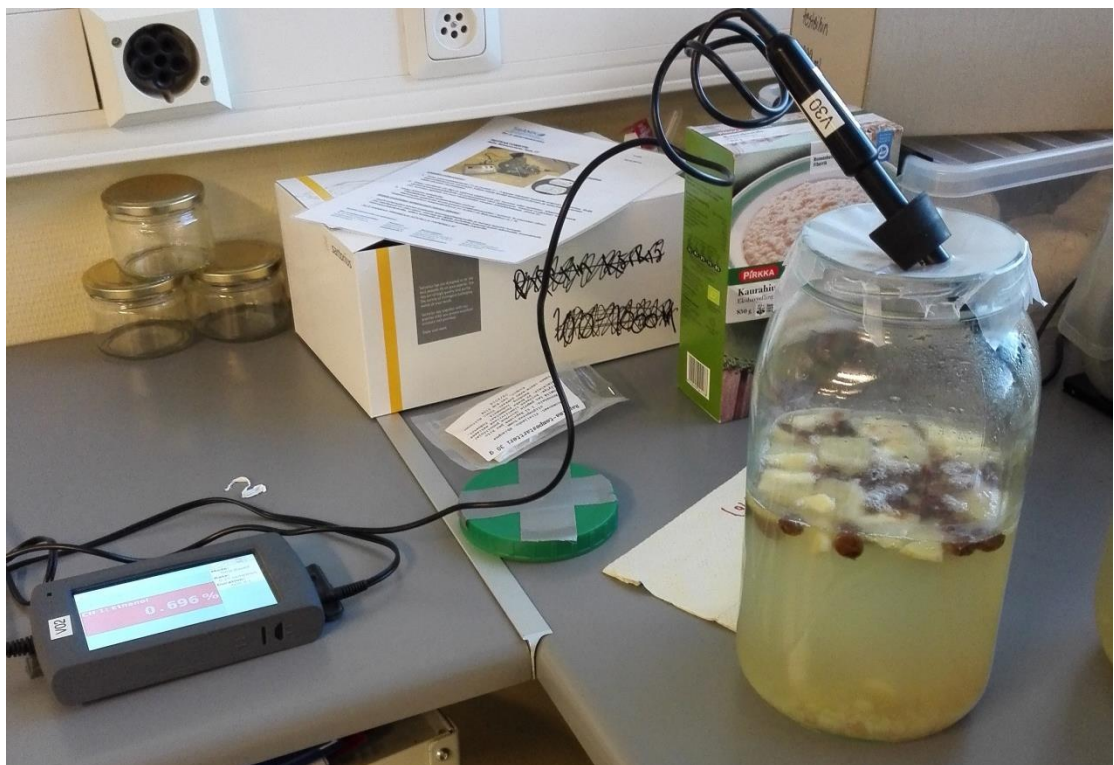
Kuva 6. Ylärivissä vanhat pH näytteet, alarivissä uudet.

Kuvissa 5 ja 6 nähdään uuden ja vanhan pH-sarjan värimuutokset. Kameran salamavallo hieman vaikeuttaa kuvien tulkintaa, mutta näytteiden värisävyjen erot olivat melko huomattavia uuden ja vanhan puskurisarjan vertailussa. Kuukauden

ajan säilötyt näytteet olivat huomattavasti ruskeamman tai oranssimman värisiä vertailukohteena olevaan uudempaan näytteeseen nähden, pH-arvosta riippuen. PH-sarjassa lisättiin 100 mikrolitraa kefiirinäytettä onnistuneesta fermentointierästä sekä 900mikrolitraa puskuriliuosta. Tutkittiin spektrofotometrillä absorbanssin muutoksia aallonpituudella 520.

3.5 Mikrobiseoksella fermentointi

Fermentoinnissa käytetyn mikrobiseoksen eli kefiirin resepti ja valmistustapa löytyy liitteistä. Fermentointityö aloitettiin herättelemällä kefiirit ravintoliuoksella, jossa oli rusinoita, sitruunaa, inkivääriä, soodaa sekä sokeria. Kefiirit siirrettiin ravintoliuokseen ja aktivoitumista tarkkailtiin tarkistuskäynnillä. Tällöin mitattiin Vernier-kaasuanturilla kefiiripurkkien etanolipitoisuutta, jotta nähdään oliko käymistä tapahtunut. Kaasutilassa oli anturilla mitattuna 0,696% etanolia, eli kefiirit olivat aktivoituneet ravintoliuoksessa. Lisäksi mitattiin kefiiri-liuoksen pH joka oli tällöin 4,8. Kuvassa 7 nähdään Vernier-laitteistoon kytketyllä anturilla tapahtuva etanolin mitta.



Kuva 7. Etanolin mittaaminen Vernier-laitteistolla.

Variksenmarja-kefiirifermentointi aloitettiin suunnitteleamalla käsittelyseos. Päädyttiin kokeilemaan menetelmää joka perustuu artikkeliin Viljanen (2014, 149). Työn alussa desinfioitiin lasipurkit 100 asteisella vedellä. Lisättiin kefiiristä 1dl mikrobistoa nestemäisenä kefiiriliemenä ja 100 grammaa marjamurskaa desinfioituihin lasipurkkeihin. Kefiiri suodatettiin siivilän läpi ennen marjamurskaan lisäämistä. Referenssiksi tehtiin rinnakkaisnäytteet joissa jokaisessa näytteessä oli 1dl kattilassa 3min ajan keitettyä kefiirilientä ja 100 grammaa murskattuja marjoja. Niin näytteitä, kuin referenssejäkin, oli kolme näytettä.

Kefiiri-variksenmarjaseoksen pH säädettiin pH 6:n tuntumaan ruokasoodalla. Oheisessa taulukossa (taulukko 3) näkyy mitatut ruokasooda-määrät sekä näytteiden pH-arvot. Myös referenssien pH on esitetty kaaviossa. Kefiiriliemen pH ennen marjamurskaan lisäämistä oli 4,37 ja marjamurskan pH oli 3,63.

Taulukko 3. Kefiirinäytteisiin lisätyt soodan määrät ja näytteiden pH ennen fermentointia.

	kefir1	kefir2	kefir3	ref1	ref2	ref3
alku pH	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,7
Lisätty sooda (g)	7,0783	7,015	7,010	0	0	0
loppu pH	6,03	6,04	6,04	3,78	3,78	3,74

Näytteiden pH säätövaiheessa näytteitä sekoitettiin soodan lisäämisen jälkeen ja annettiin näytteen levätä että sooda sai aikaa vaikuttaa pH:n muutokseen ennen mittausta, jotta mittaustulos olisi mahdollisimman todenmukainen. Fermentoinnin alkaessa näytteiden pH oli säädetty kuuteen.

Tässä työssä näytteitä fermentoitiin seitsemän päivää huoneenlämmössä. Kuvassa 8 näytteet ovat valmiina fermentoinnin aloitukseen.



Kuva 8. Näytteet valmiina fermentointiin. Edessä referenssit, takana kefiirinäytteet.

Seitsemän päivän fermentoitumisen jälkeen mitataan näytteiden pH, että nähdään onko fermentointi onnistunut. Fermentoinnin onnistuessa pH:n pitäisi laskea huomattavasti. Kefiirinäytteistä vain kolmas fermentointi oli onnistunut. Näytteen 1 pH oli fermentoinnin jälkeen 5,51, näytteen kaksi 5,53 ja näytteen kolme pH 3,74. Referensseistä hylättiin yksi näyte, referenssi 1, jonka pH laski omituisesti näytteiden fermentoinnin aikana pH 2,64:n. Työssä päädyttiin käyttämään vain referenssi 3:sta, sillä sen pH oli hyvin lähellä kefiirinäytteen pH:ta, jolloin happamuuseron ei tulisi vaikuttaa tulokseen. Referenssi 2:n pH oli 3,49 ja Referenssi 3:n pH oli 3,54.

Fermentoinnin aloituspäivänä referenssi näytteet olivat kaikki juoksevia, ja niissä oli pieni kerros vaahtoa päällä. Kefiirinäytteet taas olivat hieman hyytelömäisiä ja niissä oli kaasukupla muodostumia (näytteissä 2 ja 3 pinnalla ja näytteessä 1 oli keskellä kaasukuplavyö). Viikon fermentoinnin jälkeen näytteet 1 ja 2 olivat melko juoksevia ja niissä oli pinnalla joitain kaasukuplia. Näyte kolme oli juoksevahko ja siinä oli paksu kerrostuma kaasukuplia.

Syytä fermentoinnin epäonnistumisille ei ole tiedossa. Kaikki purkit oli desinfioitu ennen käyttöä ja käytetyt marjat sulatettu kuumavesi hauteessa. Ainoa ero kefiirinäytteiden kohdalla oli marjojen murskaustapa, näytteissä 1 ja 2 oli kaikki marjat

survottu sauvasekoittimella kun taas näytteessä 3 osa marjoista oli survottu sauvasekoittimella ja osasta vain murskattu kuorta. Luultavasti marjan murskaustapa ei kuitenkaan liittynyt fermentoinnin onnistumiseen, mutta varmaa syytä epäonnistumiselle ei ole tiedossa.



Kuva 9. Kefiirinäyte 1 ennen soodan lisäystä.



Kuva 10. Kefiiri-marjamurska soodan lisäyksen jälkeen.

Kuvissa 9 ja 10 näkyy näytteen värimuutos soodan lisäyksessä, pH:n muutos luo hyvin selviä eroja marjamurskan väriin. Ennen soodan lisäystä näyte oli kauniin

punainen, kun taas soodan lisäyksen jälkeen näyte tummeni huomattavasti ja sai sinertävän sävyn.

Kefiirinäyte 3, referenssi 2 sekä referenssi 3 suodatettiin Büchner-suppilolla ja imupullolla jotta saatiin erotettua kefiiri ja marjamurska marjamehusta sekä saatiin fermentointiprosessi pysäytettyä. Referenssin 2 suodatuksessa kesti noin 15 minuuttia kun taas referenssi kolme suodattui 34 minuuttia ja kefiirinäyte 24 minuuttia. Referenssi 2:n mehun saanto oli 150ml, referenssin 3 156ml ja kefiirinäytteen saanto oli 176ml. Näiden tutkimusten valossa näyttäisi että fermentointi voisi parantaa mehun saantoa. Kuvassa 11 nähdään kuva suodatusprosessista ja taulukossa 4 on listattuna suodatetun mehun saannot.

Taulukko 4. Mehunsaanto suodatuksessa, kefiirinäyte sekä referenssit.

Näyte	Mehun saanto
Referenssi 2	150 ml
Referenssi 3	156 ml
Kefiirinäyte 3	176 ml



Kuva 11. Suodatus Büchner-suppilolla.

Kefiirinäyte 3:sta ja referenssi 3:sta otettiin 0,1ml näytettä ja 0,9ml tislattua vettä minisentrifugiputkiin. Nämä 1ml:n näytteet käytettiin vielä varmuudeksi sentrifugissa, 13 000rpm viisi minuuttia. Suodatus olisi luultavasti ollut riittävä esikäsitely ennen värin mittauksia, sillä sakkaa ei ilmestynyt pohjalle.

3.6 *Rhizopus oligosporus* fermentointi

Työssä kokeiltiin variksenmarjafermentointia *Rhizopus oligosporus* -homeella kaura-marja seoksessa. Koska *Rhizopus oligosporus* kasvatetaan usein herneillä, päädyttiin lisäämään marjamurskan lisäksi jotakin rasvapitoista elintarviketta, tässä työssä valikoitui kaurajyvät ja -hiutaleet. Tehtiin kaksi erilaista koetta, yksi koesarja kaurahiutaleilla ja marjamurskalla ja toinen kokonaisilla kauranjyvillä ja marjamurskalla. Molemmissa sarjoissa oli kauraa kolme neljäsosaa ja marjaa yksi neljäsosa.

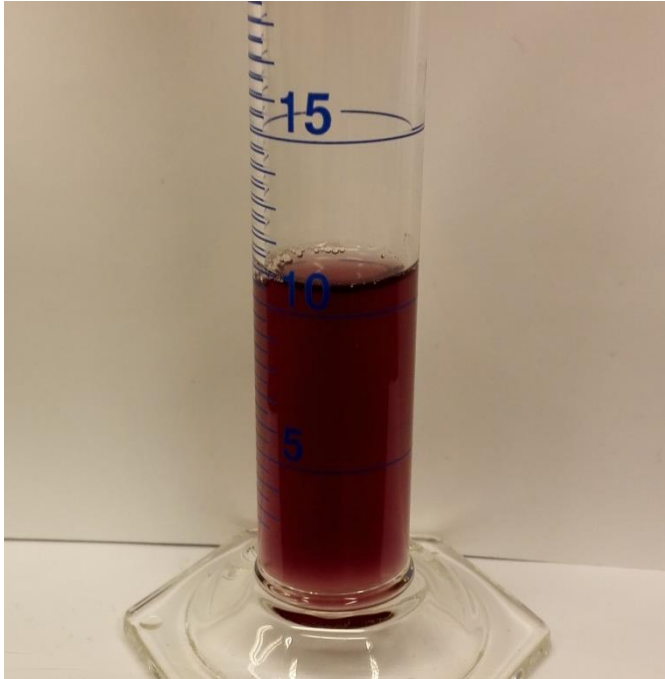
Kaurahiutaleversiossa kaurahiutaleita oli 63g per erä, johon lisättiin 1,5dl vettä ja annettiin hiutaleiden hieman turvota. Sitten lisättiin *Rhizopus oligosporus* - itiöjauhetta 0,25g ja marjamurskaa noin 21 grammaa. Näytteitä tehtiin yhteensä neljä, joista kaksi fermentoituivat yön yli 37-asteisessa lämpöhauteessa ja kaksi näytettä huoneenlämmössä. Seuraavana aamuna korkkeja hieman avattiin ja jätettiin näytteet fermentoitumaan vielä päiväksi.



Kuva 12. *Rhizopus oligosporus* kaura-marjaseoksessa kaksi päivää fermentoituneena.

Kuvan 12 mukaisesti marja-kaurahiutale-itiöjauheseos oli fermentoitunut onnistuneesti, tai ainakin itiöt olivat kasvaneet hyvin kaurahiutale-marjaseoksessa. Kaurahiutaleet olivat puuroutuneet voimakkaasti kosteassa ympäristössä.

Näytteet suodatettiin Büchner-suppilolla, kuten kefiirinäytteetkin. Mehua saatiin suodatettua RO1 näytteestä 12ml, RO2 näytteestä 4,9ml, RO3 näytteestä 5,1ml ja RO4 näytteestä 4,8ml. Mehun pH näytteissä oli 5,6. Näytteiden mehu oli niin laimeaa että siitä sai Vernier-laitteistolla spektrit myös ilman laimennusta, joten näytteet jätettiin laimentamatta. Kuvassa 13 RO1 näytteen mehunsaanto.



Kuva 13. Näyte RO1 suodatuksen jälkeen.

Toisena työnä *Rhizopus oligosporus* -itiöjauhetta sekoitettiin kokonaisten kaurajyvien kanssa. Kauranjyviä liotettiin vuorokauden ajan ja murskattiin huhmarella kuoria rikki. Punnittiin 30 grammaa kauraa per näyte ja tehtiin kaksi näytettä. 30 grammaan kauraa lisättiin 10 grammaa murskattua marjaa sekä 0,125 grammaa itiöjauhetta. Näytteet sekoitettiin ja pH säädettiin ruokasoodalla pH 7n tuntumaan. Alku-pH näytteissä oli 4,1 ja 3,9. Ensimmäiseen erään lisättiin soodaa 0,3g soodaa ja pH nousi kahdeksaan. Toiseen erään lisättiin 0,105g ja näytteen pH nousi soodan lisäyksen jälkeen 7,6.



Kuva 14. *Rhizopus oligosporus* -itiöjauhe kokonaisessa kaurassa ja marjamurskassa ennen fermentointia.

Kuvassa 14 näytteeseen ei ole vielä lisätty ruokasoodaa. Soodan lisäämisen jälkeen näyte oli lähes mustaa. Lasipurkin päälle laitettiin muovikelmua jossa oli hengitysreikiä, jotta itiöt saavat happea. Näytteiden annettiin fermentoitua vuorokauden huoneenlämmössä. Näytteisiin kasvoi itiörihmastoa, mutta fermentoinnin jälkeen näytteistä ei saatu erotettua mehua.

4 VÄRIN STABIILISUUS

Työssä tutkittiin näytteiden spektrikuvaajia sekä tarkasteltiin värien valonkestävyyttä. Valokokeen jälkeen otettiin uudet spektrit Vernier-laitteistolla, jotta nähtiin kuinka käyrät eroavat valokäsittelyn jälkeen. Valokokeen eri vaiheissa otettiin ylös spektrofotometrillä näytteiden absorbanssiarvoja, joista voidaan nähdä valossa olon vaikutusta värien stabiiliteettiin. Antosyaanien stabiilisuus on parhaimmillaan pH:ssa 3 tai alle. (Francis 1999, 108) Tutkimuksessa käytettyjen näytteiden pH-arvot ovat kuitenkin yli pH 3, kuten edellä esitetyissä menetelmä osioissa kirjoitetaan.

Valokokeessa käytettiin ledilamppua jotta saataisiin tutkittua valon vaikutusta stabiiliteettiin ilman että lampusta tuleva lämpö vaikuttaisi tuloksiin. Lamppu oli 19cm etäisyydellä näytteistä. Tuloksien arviointia hieman vaikeuttaa, että näytteet hyytelöityivät hieman minisentrifugiputkissa, luultavasti näytteiden pektiinipitoisuuden takia.



Kuva 15. Valokokeessa käytetty lamppu sekä kefiirinäytteet minisentrifugiputkissa.

Näytteet asetettiin suoraan lampun alle (kuva 15), jotta valo tulisi tasaisesti näytteisiin. Näytteet aseteltiin tasaisesti alueelle johon valo paistoi suoraan.

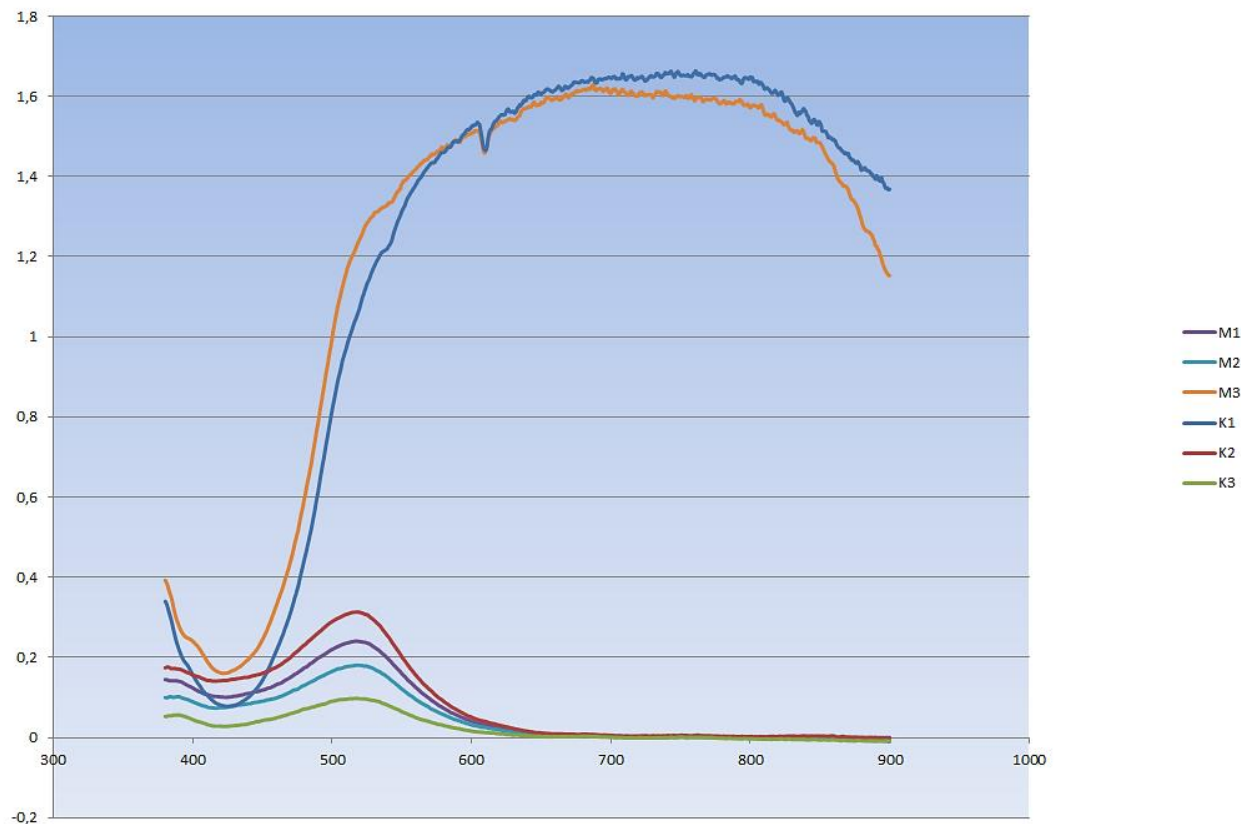
Aiemmin esiteltujen töiden lisäksi tehtiin onnistuneesta fermentointinäytteestä sekä sen rinnakkaisnäytteestä tehty kivennäisvesisovellus, jossa kivennäisvettä värjättiin näytteillä. Näiden rinnalle tehtiin myös lietetuista kokonaisista marjoista

sekä marjamurska liotuksesta kivennäisvesi-värjäys. Näistäkin töistä tehtiin valokokeilu, missä tarkasteltiin Vernier-spektrejä sekä absorbanssimuutosta. Lisäksi vertailukohteena oli valolta suojattuna ollut vertaisryhmä. Kuvassa 16 nähdään kaikki näyte-erät valokokeessa. Ylhäällä sienifermentointi, vasemmalla marjamurskasta ja kokonaisesta marjasta liuotetut väriaineet, keskellä uusi pH-sarja ja oikealla kefiirifermentointi referenssi näytteineen.



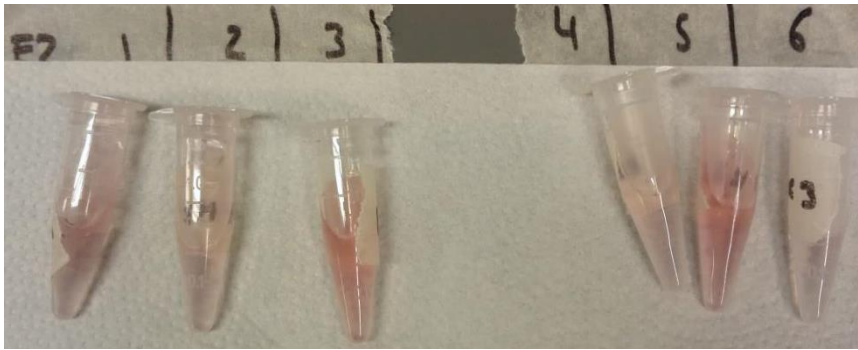
Kuva 16. Näytteet valolle altistettuna.

4.1 Liuotustyö



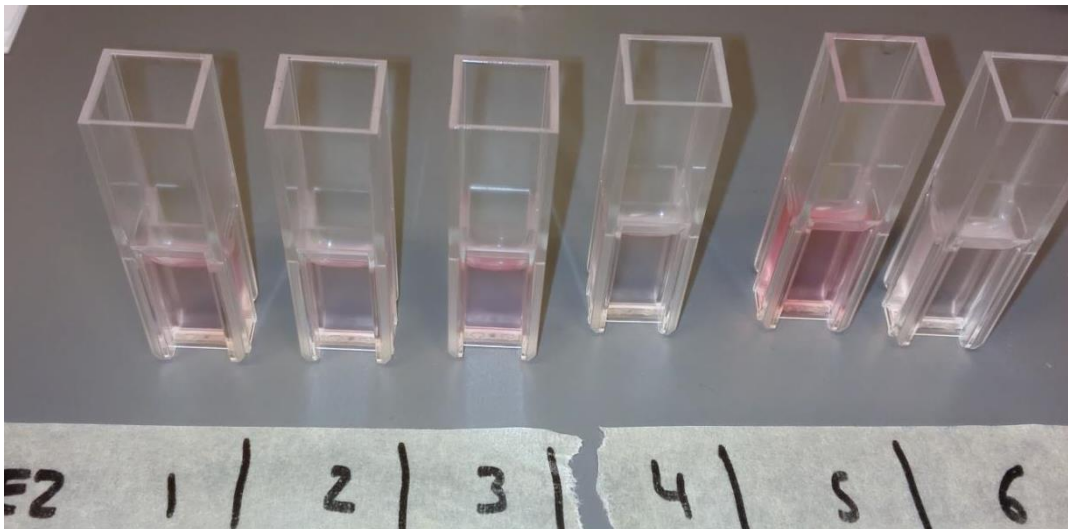
Kuvio 3. Kokonaisen marjan sekä murskatun marjan spektrit Vernier-laitteistolla ennen valokoetta.

Kuviossa 8 kuvataan näytteiden M1–M3 sekä K1–K3 spektrikuvaajia ennen valokoetta. Y-akselilla nähdään absorptio ja x-akselilla aallonpituus. Kuvaajassa näytteet K1 (tummansininen käyrä) ja M3 (oranssi käyrä) ovat luultavammin jollain tapaa virheellisiä mittaustuloksia, sillä silmämääräisesti näytteet olivat hyvin samankaltaisia, toki sävyeroja näytteissä oli. M2 näytteen käyrän voisi selittää näytteen värittömyys, sillä kuvassa 12 nähdään M2 näytteen olevan melko väritön. Huippukohta näyttäisi olevan aallonpituuden 700nm jälkeen, mikä on näkyvän valon alueen ulkopuolella. M3 näytteen käyrä kuitenkin yhteneväisyydessään kumoaa kuitenkin tämän väitteen, sillä näytteessä M3 on silmämääräisesti havaittava väri. K2 eli tummanpunainen käyrä, oli silmämääräisesti eniten punainen.



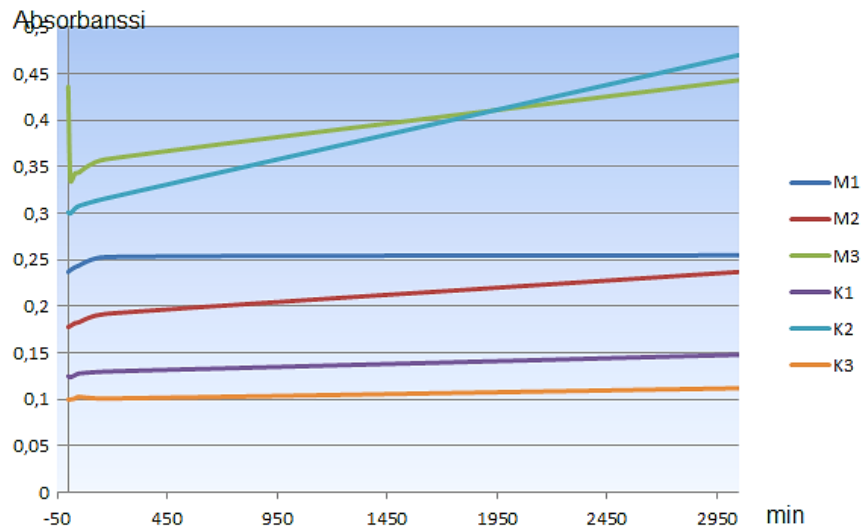
Kuva 17. Näytteet M1-M3 sekä K1-K3 ennen valokoetta.

Kuvassa 17 näytteet ovat kyvetissä ensimmäisen spektrofotometrillä tehdyn absorbanssimittauksen jälkeen. Silmämääräisesti näytteissä on melko selviä värieroja, vaikka näytteet on pipetoitu samoilla määrillä. Selityksenä lienee marjamehusta pipetoitu osio, joka voi olla enemmän tai vähemmän mehupitoinen pipetointierästä riippuen, mikäli väriainetta sisältävät yhdisteet eivät ole jakaantuneet tasaisesti nesteeseen.



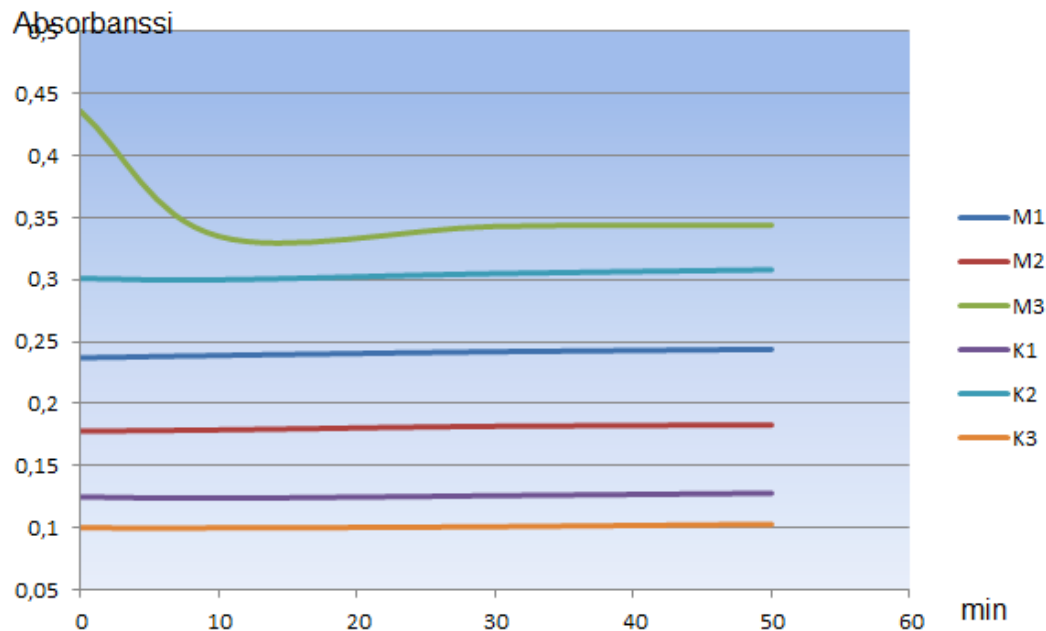
Kuva 18. Näytteiden silmämääräiset värit. Näytteet kyveteissä vasemmalta katsottuna M1-M3 ja K1-K3.

Kuvasta 18 voidaan huomata kuinka paljon haaleampi väri yksinkertaisella vesiliuotuksella tuli esimerkiksi kefiiri näytteeseen verrattuna.



Kuvio 4. Näytteiden M1-3 sekä K1-3 absorbanssi muutokset valokokeen aikana.

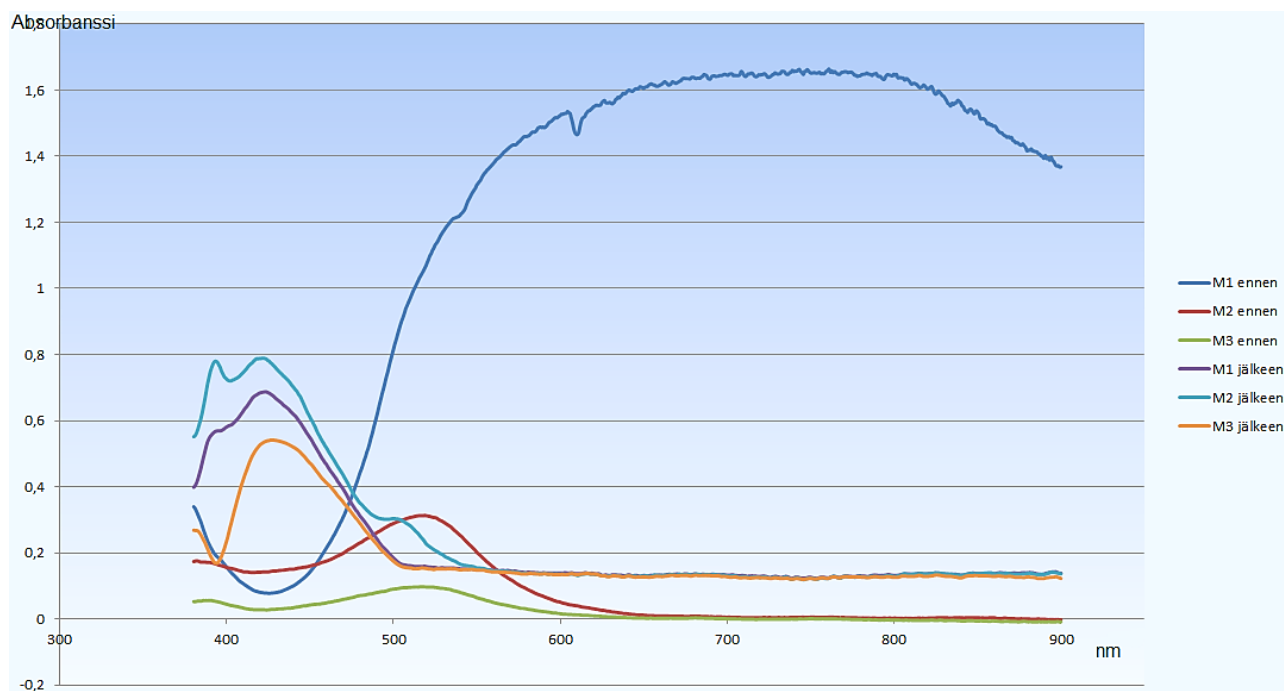
Kuviossa 9 nähdään aallonpituudella 520nm näkyvät absorbanssimuutokset valolle altistusaikaan (min) verraten. kohdassa 3050 minuuttia, näytteet olivat olleet hieman yli kaksi päivää valossa. Kuviossa on käytetty spektrofotometrillä aallonpituudella 520nm otettuja absorbanssi arvoja valokokeen erivaiheissa. Kuviossa 10 nähdään samat tulokset lyhyemmältä aikaväliltä, 0-50 minuuttia.



Kuvio 5. M1-M3 sekä K1-K3 näytteiden absorbanssi muutokset aallonpituudella 520 valokokeen aikana. 0-50 minuuttia.

Koko valokokeen aikana (3050 minuuttia) näytteiden M2, M3 ja K2 väri-intensiteetti kasvoi huomattavasti loppua kohden. Muiden näytteiden absorbanssit kasvoivat hieman hillitymmin. Väri-intensiteetin tulisi antosyaaneilla laskea valokokeen aikana, joten joko nesteen hyytelöityminen näytteissä aiheutti väri-intensiteetin kasvun, tai sitten variksenmarjassa esiintyvät antosyaanit ovat huomattavan valokestäviä.

Kuvaajat näyttävät kuviossa 9 melkein ainoastaan valokokeen loppuosan, joten valokokeen alkua havainnollistamaan tehtiin toinen kuvaaja, kuvio 10, jossa nähdään absorbanssin muutokset aikavälillä 0–50 minuuttia. Tässä kuvaajassa voidaan huomata näytteessä M3 oletetunlainen absorbanssin lasku, mutta M3 näyte oli silti odotusten vastaisesti ainoa näyte jossa nähtiin selvä intensiteetin lasku, joka oli odotettu tulos kirjallisuuslähteiden mukaisesti. Kuitenkin tämänkin näytteen intensiteetti lähti nousuun 10-15 minuutin valolle altistamisen jälkeen. Muiden näytteiden absorbanssiarvot näyttävät kuvaajien mukaan lähteneen nousemaan alusta asti.

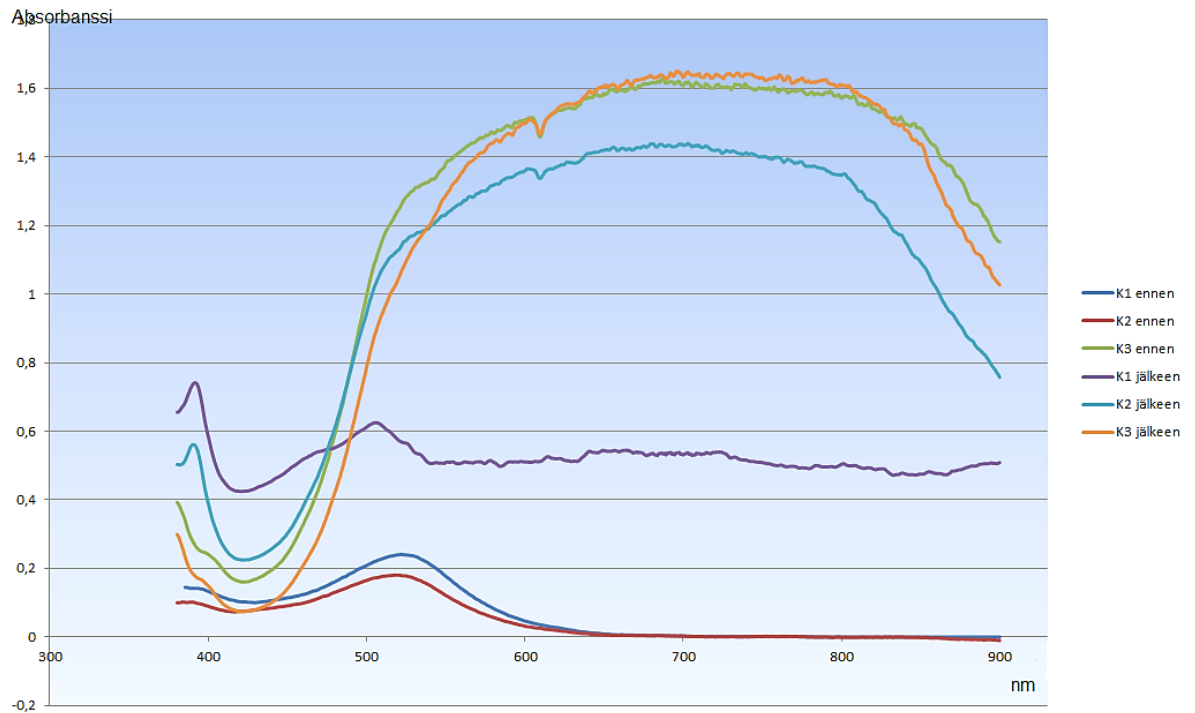


Kuvio 6. M1–M3 näytteet ennen valokoetta ja valokokeen jälkeen.

Kuviossa 11 esitetään marjamurskasta liuotettujen näytteiden absorbanssia (y-akseli) eri aallonpituuksilla (x-akseli). M1 käyrän kuvaaja ennen valokoetta lienee jollain tapaa virheellinen, sillä käyrän huippukohta on hyvin erilainen kuin

rinnakkaisissa näytteissä M2 ja M3. Aallonpituudella 600nm oleva huippu voisi tarkoittaa värisävyyn muuttumista sinisempään, sillä 595–650nm aallonpituudella havaitaan silmämääräisesti sinivihreää väriä. Kuvaajan rakenne on kuitenkin kokonaisuudessaan omituinen, sillä selkeää huippukohtaa ei rakennu ja osa kuvaajan käyrästä on näkyvän valon alueen ulkopuolella, mikä voisi viitata värittömyyteen. Kuvaajan absorbanssilukemat ovat myös huomattavan korkeat, kuvaajan yltäessä 1,6 alueelle, kun muissa näytteissä ennen valokoetta absorbanssikäyrä on maksimissaan 0,3 luokkaa. Korkea absorbanssin pitäisi viitata suureen väri-intensiteettiin, mikä tuskin on mahdollista näin laimeassa näytteessä. M2 ja M3 näytteiden huippukohdat sijoittuvat aallonpituudelle 520nm, jonka pitäisi näyttää punaisen värin aluetta.

Valokokeen jälkeen käyrien huippukohdat ovat selvästi muuttuneet 420nm–460nm alueelle. M2 ja M3 näytteiden ennen valokoetta samankaltaiset käyrät ovat valokokeen jälkeen hieman erilaistuneet, mutta huippukohta on molemmissa yhtenevästi 420nm aallonpituudella. Myös M1 näyte käyttäytyy valokokeen jälkeen muiden näytteiden kanssa yhtenevästi. Hendry (1996, 58, 277) kirjoittaa antosyaanien absorboivan 420nm aallonpituudella ruskeaa väriä. Hendry myös kirjoittaa punaisen antosyaani värin näkyvän antosyaanista riippuen aallonpituuksilla 465–550nm ja useissa tapauksissa värisävy hajoaa ruskeansävyyn, joka näkyy aallonpituuksilla 400–440nm ja kuvastaa antosyaanin värin heikkenemistä. Spektreistä voidaan siten arvioida käyrän huippukohdan muutoksen johtuvan punaisen värisävyyn hajoamisesta.



Kuvio 7. K1–K3 näytteiden spektrit ennen valokoetta ja valokokeen jälkeen.

Kuviossa 12 esitetään kokonaisista marjoista liuotettujen näytteiden absorbanssia (y-akselilla) eri aallonpituuksilla (x-akselilla). Näytteiden K3 ennen valokoetta, K2 valokokeen jälkeen sekä K3 valokokeen jälkeen ovat Muodoltaan hyvin poikkeavia muiden näytteiden käyriin verrattuina. Näiden näytteiden käyrissä ei ole selvää huippukohtaa, ja kuvaajan absorbanssi määrät ovat lähes kaksinkertaisia muihin näytteisiin nähden. Huippukohta näytteissä lienee 680nm paikkeilla. K3 käyrä on pysynyt hyvin samankaltaisena valokokeen aikana. Käyrät kuitenkin vaikuttavat virheellisiltä omituisen muotonsa vuoksi, joten tulosarvoa niillä ei välttämättä ole. Osa käyrästä on näkyvän valon spektrin ulkopuolella, eikä käyrissä ole selvää huippukohtaa.

Valokokeen jälkeisessä näytteessä K1 näytteen huippukohta on muuttunut noin 380nm aallonpituudelle, mutta myös 520nm alueella on nähtävissä toinen huippukohta. 380nm aallonpituudella näkyvä huippu, voisi tarkoittaa värin kellertymistä, sillä kyseisellä aallonpituudella ihmissilmä havaitsee kellertävänvihreää väriä. Kaksi huippukohtaa näytteessä voisi täten merkitä että väri on muuttunut oranssimpaan suuntaan, sillä Sirkiä (2013) mainitsi tutkimuksessaan antosyaanien voivan absorboida väriä useammalla alueella. Näin

ollen punaisen ja keltaisen alueen huiput voisivat tarkoittaa oranssin sävyistä väriä.

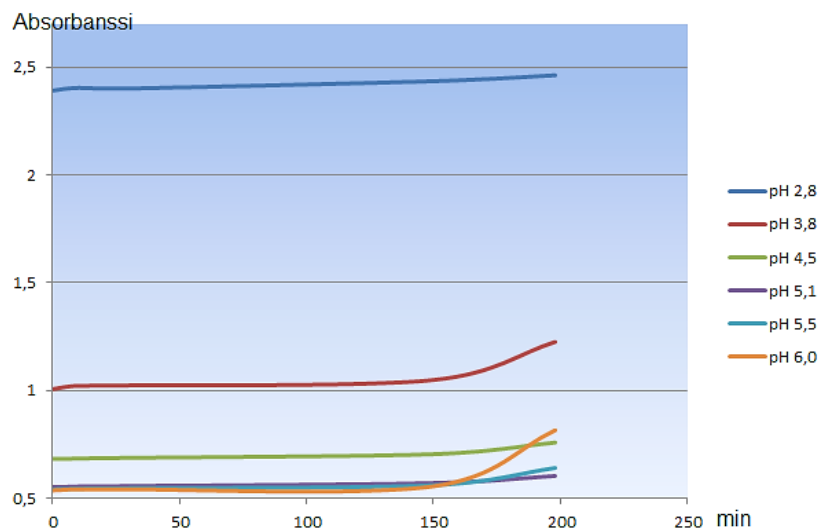
Ennen valokoetta K1 näytteen huippukohta oli 520nm alueella. Näyte K2 oli hyvin yhtenevä näytteen K1 kanssa ennen valokoetta, mutta valokokeen jälkeinen käyrä oli erikoinen.

4.2 PH-sarja, happamuuden vaikutus väriin

Taulukossa 5 on nähtävissä pH-sarjassa käytetyt pH-arvot. Otettiin Vernier-laitteistolla spektrit heti näytteen pipetoinnin ja sentrifugin (13000rpm 5 minuuttia) jälkeen.

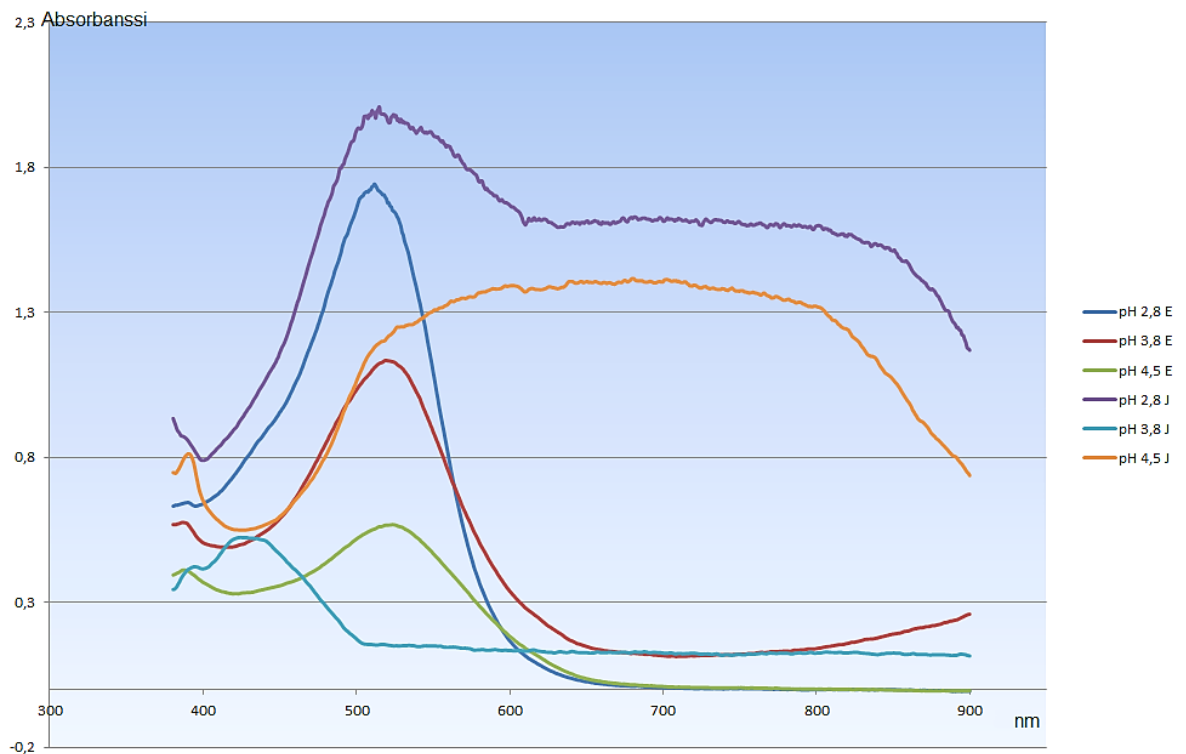
Taulukko 5. Näytteiden 1–6 pH:t pH-sarja työssä.

Näyte	pH
1	2,8
2	3,8
3	4,5
4	5,1
5	5,5
6	6,0



Kuvio 8. Mitatut absorbanssit valokokeen aikana.

Valokokeessa näytteet altistettiin valolle 0–198 minuutin ajan. Absorbanssimuutosta mitattiin kokeen aikana spektrofotometrillä. Saaduista tuloksista piirrettiin kuvaajat (kuvio 8) esittämään absorbanssin muutosta. Kirjallisuuslähteiden mukaan antosyaanin väri-intensiteetin eli absorbanssin tulisi laskea valokokeen aikana. Näin ei kuitenkaan tälläkään näytesarjalla tapahtunut. Näyte pH 2,8 nousi melko tasaisesti, kun taas pH 3,8 näytteen absorbanssi nousi radikaalisti kokeen loppupuolella. Myös pH 6:n näytteessä oli havaittavissa samanlainen absorbanssin nousu kokeen loppuosuudella. Intensiteetin kasvua on voinut aiheuttaa erilaiset kemialliset virhelähteet, joita esitellään kappaleessa 6. Myös näytteiden hyytelöityminen on voinut nostaa värin intensiteettiä.

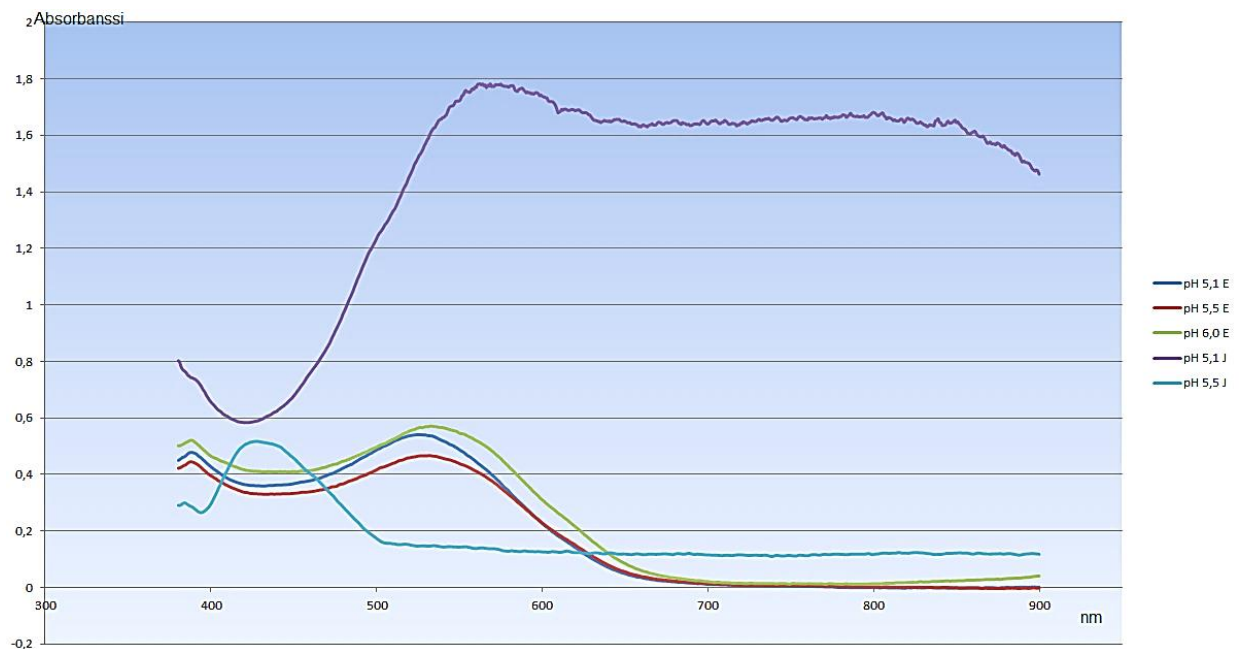


Kuvio 9. Uusien pH näytteiden pH 2,8–4,5 spektrit ennen valokoetta ja valokokeen jälkeen.

Kuviossa 9 nähdään pH näytteiden pH 2,8–pH 4,5 spektrit ennen valokoetta ja valokokeen jälkeen. Ennen valokoetta otetuissa spektreissä käyrät ovat hyvin samankaltaisia, kaikissa huippukohdat ovat aallonpituudella 520nm, mutta absorptiomäärät vaihtelevat näytteiden välillä. Absorptiohuiput seuraavat kirjallisuuslähteiden mukaan oletettua kaavaa jossa matalampi pH absorboi väriä voimakkaammin ja täten omaa korkeimman väri-intensiteetin.

Näytteen pH 2,8 käyrässä huippukohta on valokokeenkin jälkeen samoilla paikkeilla, eli aallonpituudella 520nm. Kirjallisuuslähteissä oli mainittuna, että matalissa pH-arvoissa antosyaanien väri on stabiileimmillaan. Tätä väitettä tukee spektreissä voimakkaana säilyvä punaisen värin huippukohta. PH 3-arvon jälkeen antosyaanien stabiliteetin on tutkittu huononevan ja jälleen spektrimme tukee tätä väitettä, sillä näytteen pH 3,8 valokokeen jälkeinen spektri on hyvin erinäköinen valokoetta edeltävään. Kuvaajan huippukohta on vaihtunut 420nm alueelle. Tästä voidaan päätellä värisävyyn hajoonneen ruskeampaan sävyyn.

Kuitenkin pH 4,5 kuvaajan absorbanssikäyrä on huomattavasti korkeampi kuin valokoetta edeltävä. Myös kuvaajan huippukohta on muuttunut 600–700nm aallonpituudelle, eikä huippukohta ole kovin selkeä. 600–700nm aallonpituudella oleva huippukohta voisi kertoa värin sävyttymisestä sinertävään päin, sillä näillä aallonpituuksilla havaitaan väriä sinisestä sinivihreään. Spektrikäyrän muoto on kuitenkin jälleen hyvin omituinen huippukohdan puuttuessa, joten kuvaajan tulkinta on vaikeaa, koska tällaisen käyrämuodon syytä ei ole tiedossa. Kuvaajassa on myös pieni huippukohta aallonpituudella 400nm, jossa havaitaan kellertävää väriä.



Kuvio 10. Uusien pH-näytteiden pH 5,1–6,0 spektrit ennen valokoetta ja valokokeen jälkeen.

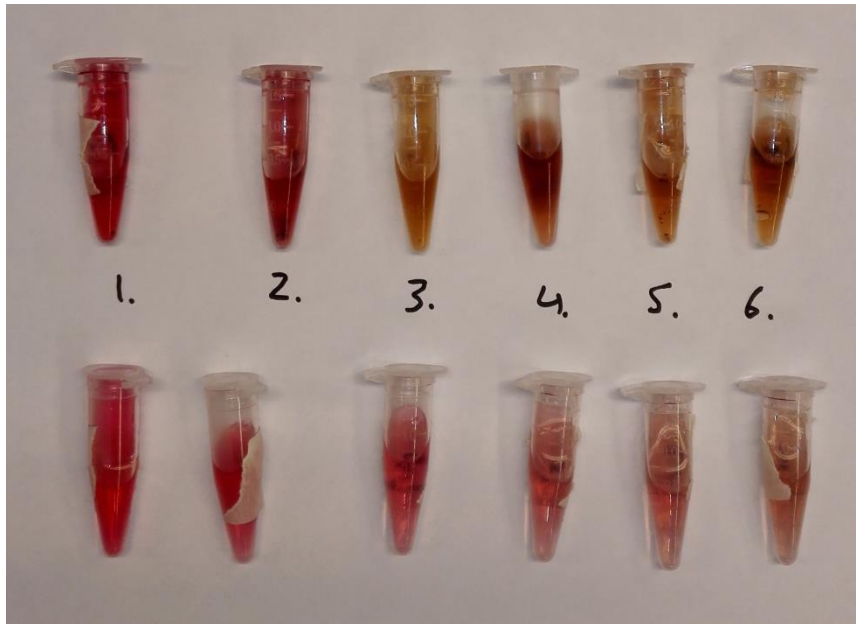
Kuviosta 10 puuttuu pH 6:n käyrä valokokeen jälkeen, koska sen excel tiedostot eivät löytyneet materiaalien joukosta. Näin ollen valokokeen jälkeen otetuissa

spektreissä on vain näytteiden pH 5,1 ja pH 5,5 kuvaajat. PH 5,1–6,0 kuvaajat ovat hyvin samankaltaiset ennen valokoetta, huippukohtaan ollessa aallonpituudella 520nm. Valokokeen jälkeen pH 5,1 näytteen käyrä on hyvin erilainen, absorbanssin kasvaessa lähes kolminkertaiseksi. Kuvaajan huippukohta on noin 560nm aallonpituudella, mikä viittaisi värisävyn muuttuneen violetimmaksi. Kuvaajista pH 5,5 oli ainoa jossa väri näytti hajoavan valokokeen aikana, sillä spektrin huippukohta on vaihtunut 420nm paikkeille.

4.3 Uuden ja vanhan pH-sarjan vertailu

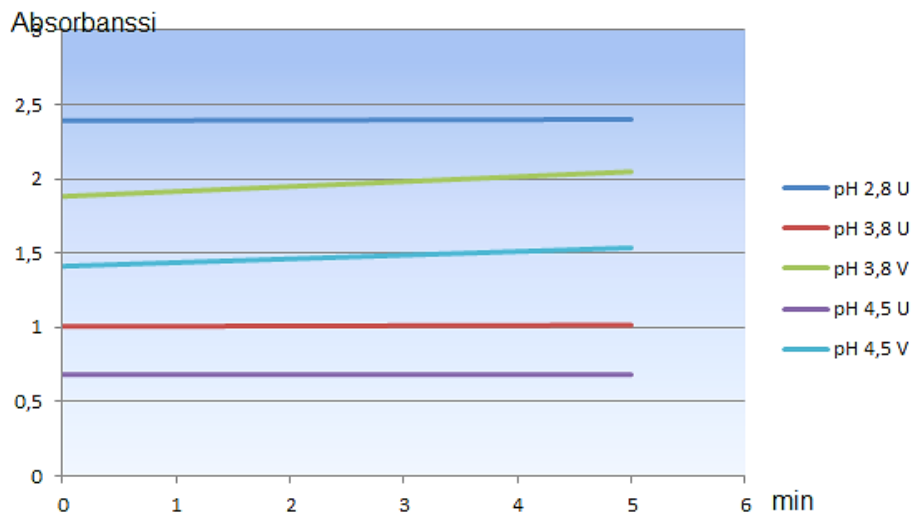
Päätettiin käyttää myös lokakuulla tehtyä pH-sarjaa uuden pH-sarjan vertailussa. Tuloksissa verrataan silmämääräistä värieroa sekä spektrofotometrillä saatuja absorbanssiarvoja. Vanhojen näytteiden tarkastelun haasteena oli, että näytteet olivat hieman samentuneet, mikä saattoi myös aiheuttaa virheitä spektrofotometrillä tehdyissä absorbanssi mittauksissa.

Kuvassa 19 nähdään vanhojen ja uusien näytteiden värierot. Kuvassa olevien näytteiden pH-arvot ovat vasemmalta oikealle 2,8–6,0. Silmämääräiset värimuutokset ovat melko huomattavia kuukauden säilytyksessä olleessa ylärivissä. Varsinkin pH 4,5–6,0 eli näytteet 3–6 ovat muuttuneet sävyltään hyvin oranssin rusehtaviksi.



Kuva 19. Yläpuolella vanhan pH-sarjan näytteet, alla uudet näytteet.

Verrattiin absorbanssi muutosta spektrofotometrillä. Tehtiin myös molemmille näytteille viiden minuutin valokoe. Näin lyhyt aika ei ehdi muuttamaan väriä kovin paljoa, mutta vanhat pH näytteet olivat hieman sameita joten päädyttiin tekemään vain lyhyt koe.

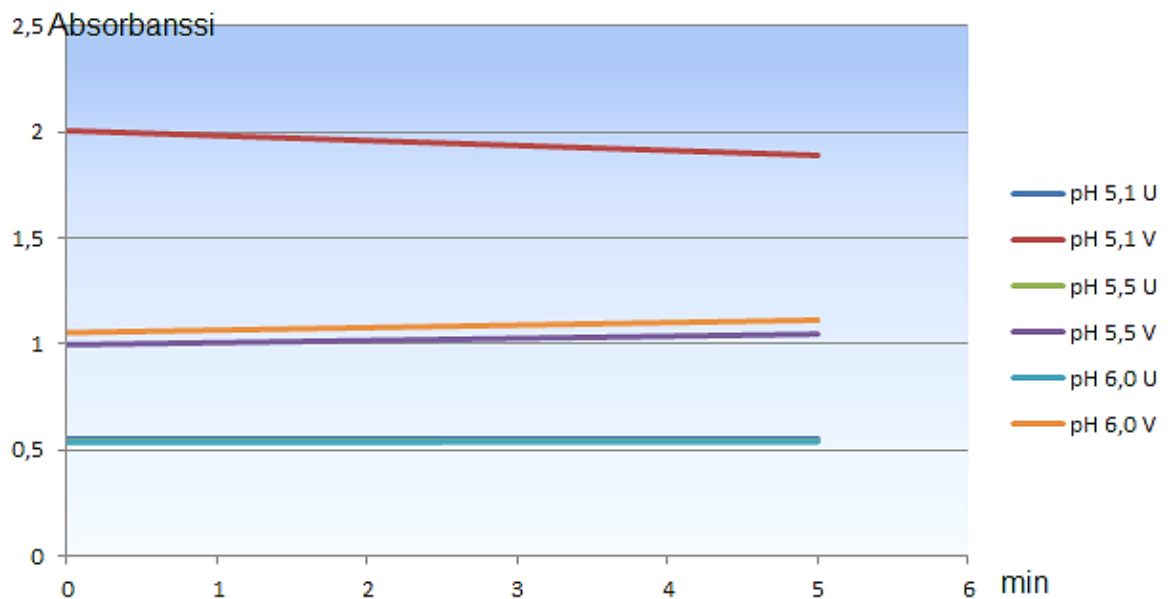


Kuvio 11. Absorbanssin muutosarvot valokokeen aikana pH näytteillä 2,8–4,5.

Kuviossa 11 nähdään 0–5 minuutin valokokeen aikaiset absorbanssimuutokset. Kuvaajassa nähdään pH 2,8–4,5 vertailut uusien ja vanhojen näytteiden välillä. Uudet näytteet on merkitty kuvaajaan U-merkinnällä ja vanhat näytteet V-

merkinnällä. Spektrofotometri ei antanut vanhasta pH 2,8 näytteestä arvoja, sillä arvot olivat absorptiomaksimissa. Tämä johtuneen näytteen tummasta väristä tai sameudesta.

Uudet näytteet olivat näillä pH-arvoilla melko stabiileja viiden minuutin valokokeessa, kun taas vanhojen näytteiden absorbanssiarvot nousivat huomattavasti. Näytteiden sameudella voinee olla tekemistä ilmiön kanssa, mutta varmuutta arvojen nousun syyille ei ole.

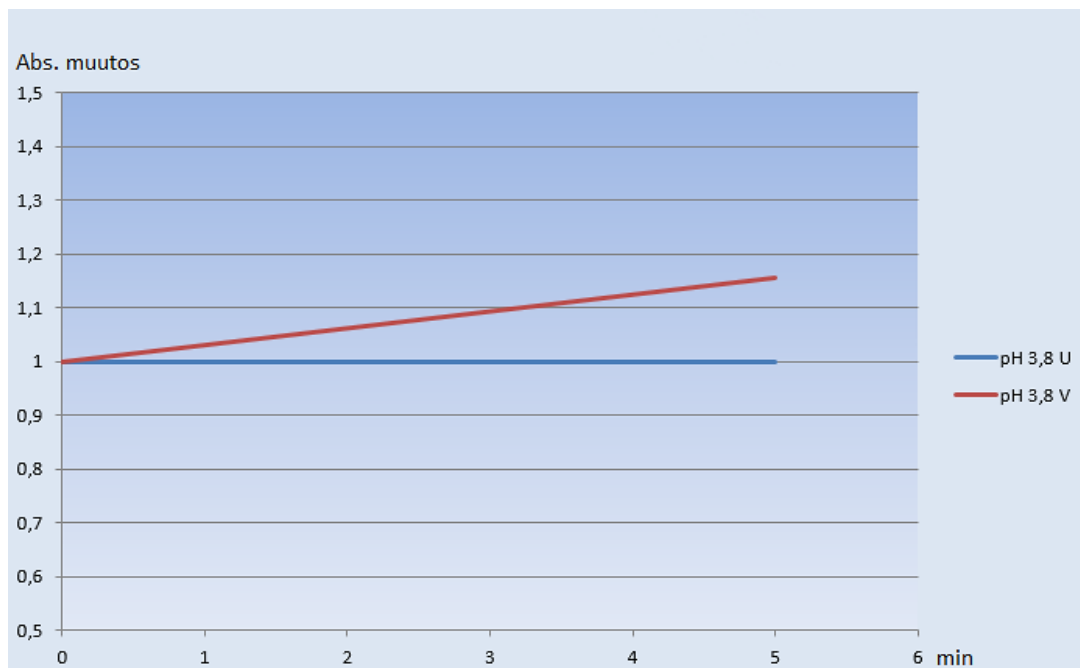


Kuvio 12. Uusien ja vanhojen pH-sarjojen absorbanssimuutokset valokokeen aikana.

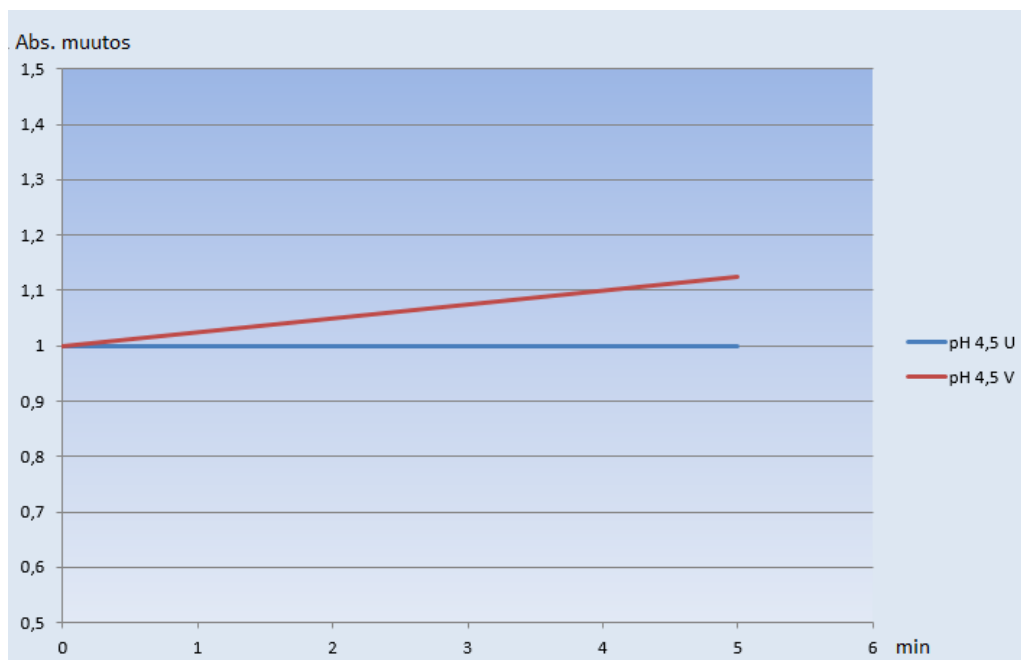
Kuviossa 12 esitetään samalla tavoin absorbanssiarvojen muutokset pH 5,1–6,0 näytteille. Kuvaajassa verrataan uusien ja vanhojen pH-sarjojen stabiilisuutta valokokeen aikana. Kaikki uudet näytteet olivat niin samanarvoisia absorbanssiltaan, että näytteiden käyrät ovat samassa kasassa absorbanssi 0,5 arvon yläpuolella. Näytteet olivat tasaisen stabiileja viiden minuutin valokokeessa. Vanhoissa näytteissä oli enemmän hajontaa, pH 5,5 ja pH 6,0 näytteiden absorbanssin hieman noustessa, pH 5,1 näytteen stabiliteetti taas laski. Näin ollen ainoastaan vanha pH 5,1 käyttäytyi odotetusti, sillä kuukauden säilytyksessä antosyaanien stabiliteetin olettaisi heikkenevän.

Näistä vertailukuvaajista voidaan huomata selviä yhdennäköisyyksiä eri pH-arvojen kohdilla, sillä vanhat pH näytteet selvästi reagoivat enemmän kuin uudet.

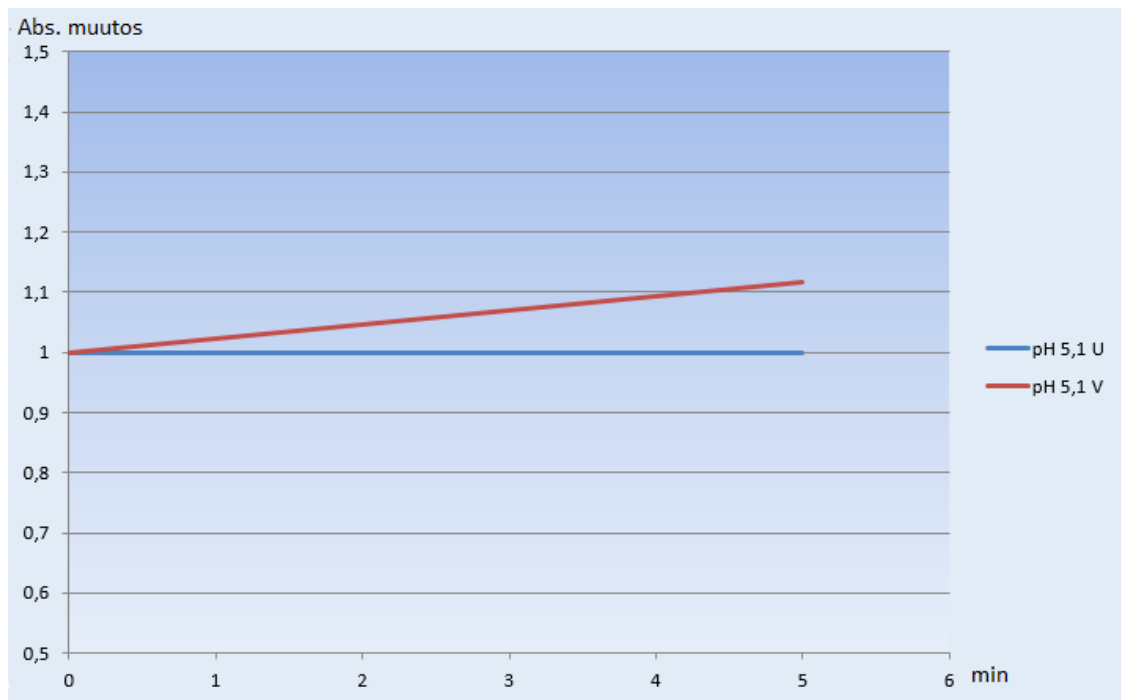
Tehtiin kuvaajista vielä havainnollistavat muutoseroa esittävät kuvaajat, jotta nähdään selkeämmin erot uusien ja vanhojen näytteiden välillä.



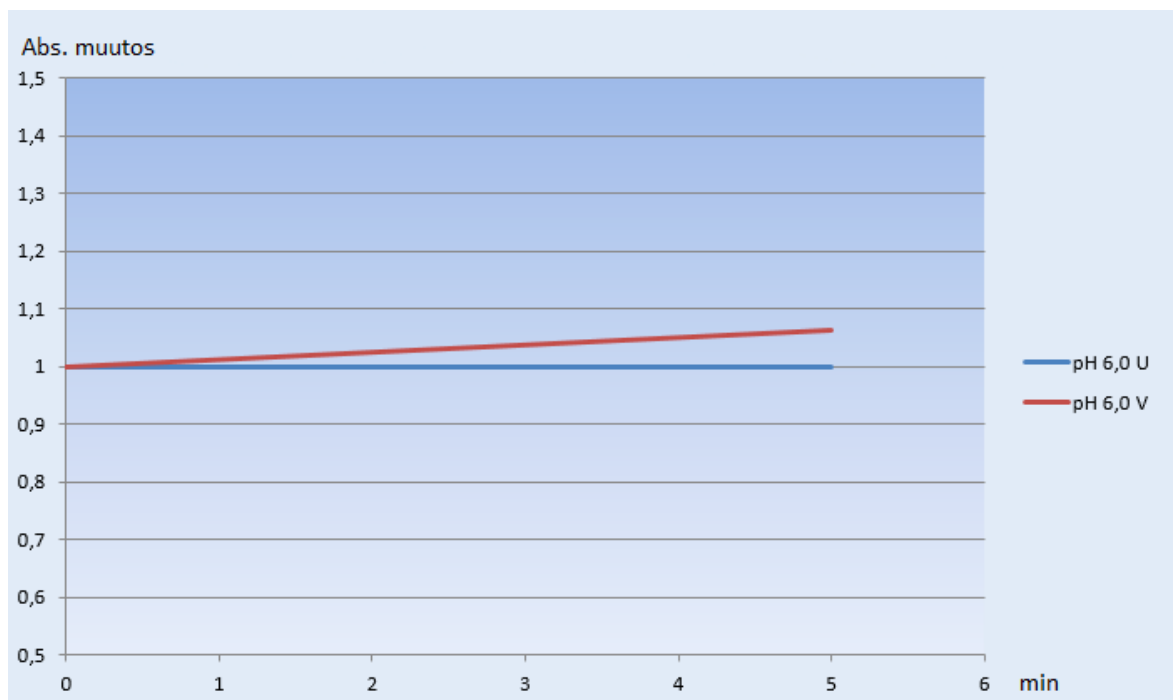
Kuvio 13. pH 3,8 uuden ja vanhan näytteen absorbanssimuutosta kuvaava kuvaaja.



Kuvio 14. pH 4,5 uuden ja vanhan näytteen absorbanssimuutosta kuvaava kuvaaja.



Kuvio 15. pH 5,1 uuden ja vanhan näytteen absorbanssimuutosta kuvaava kuvaaja.



Kuvio 16. pH 6,0 uuden ja vanhan näytteen absorbanssimuutosta kuvaava kuvaaja.

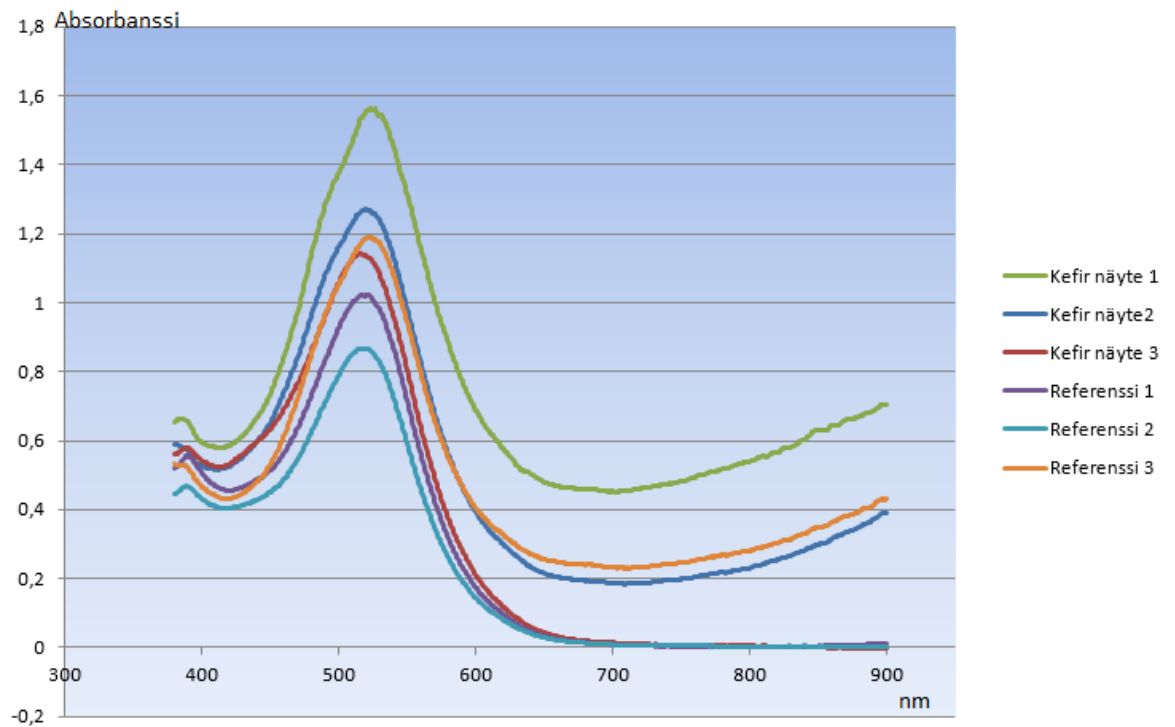
Kuvioissa 13–16 nähdään mitatuilla pH-arvoilla uuden ja vanhan näytteen välinen absorbanssimuutos viiden minuutin valokokeen aikana.

Kuvaajista nähdään selvästi samankaltainen muutos kaikilla pH-arvoilla. Vanhan pH näytteen absorbanssi muuttuu huomattavasti uuden näytteen valokokeenaikaiseen käyrään verrattuna. Johtopäätöksenä voidaan olettaa valokokeen tulosten perusteella, että vanhentuessaan näytteet alkavat reagoimaan huomattavasti herkemmin erilaisiin prosessointeihin. Voidaan olettaa että vanhempi näyte reagoisi samankaltaisesti myös muissa mahdollisissa prosesseissa. Tämän tutkimuksen perusteella voidaankin olettaa että näytteet vanhentuvat ja reagoivat vahvemmin prosessointiin vanhana kuin uutena. Stabiiliteetin muutos lienee siis korreloivan näytteen ikään.

4.4 Kefiirifermentointi

Alla olevassa kuvaajassa (kuvio 17) on esitetty Vernier -laitteiston mitaamat spektrit kuvaajana. Kefiiri näytteet 1–3 sekä rinnakkaisreferenssit 1–3 ovat kaikki laimennossuhteella 1:10 1 millilitran sentrifugiputkissa siten että kefirinäytteissä on 0,1 ml kefiirimehunäytettä ja 0,9 ml tislattua vettä ja referensseissä 0,1 ml referenssimehua (kiehutetulla kefiirillä) ja 0,9ml tislattua vettä.

Kuvaajassa (kuvio 17) voidaan nähdä, kuinka kefiirinäytteiden 1 ja 2 huippukohta on ennen valokoetta korkeampi kuin referenssien. Suurin ero huipun korkeudessa on kefiirinäyte 1 ja referenssi 2 näytteiden välillä. Eroa on myös käyrien loppuosissa, missä kefiirinäytteillä voidaan huomata nousu 600–900nm alueella, kun taas referenssit laskevat aallonpituuden 600nm jälkeen arvoon nolla. Aallonpituudella 600–780nm havaitaan silmämääräisesti sinivihreää väriä, joten tämä pieni huippu lienee tarkoittavan sävyeroa kefiiri- ja referenssinäytteiden välillä.

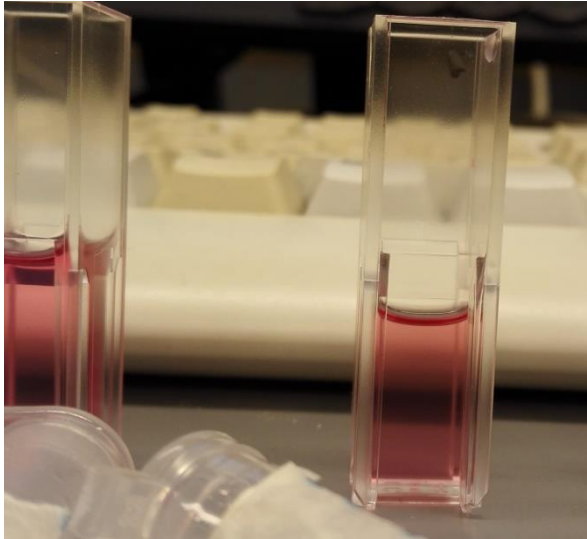


Kuvio 17. Kefiiri- ja referenssinäytteiden spektrit ennen valokoetta.

Kirjallisuuslähteissä on mainittu aallonpituus 520nm punaisen antosyaanin absorbanssimaksimi kohtana, joten oletettavasti korkeampi huippu kefiirinäytteiden käyrässä voisi kuvata vahvempaa punaista väriä kuin referensseissä. Aallonpituus 650–900nm eroavaisuudetkin varmasti vaikuttavat näytteiden eroissa ja ominaisuuksissa, mutta osa alueesta on näkyvän valon spektrin ulkopuolella.

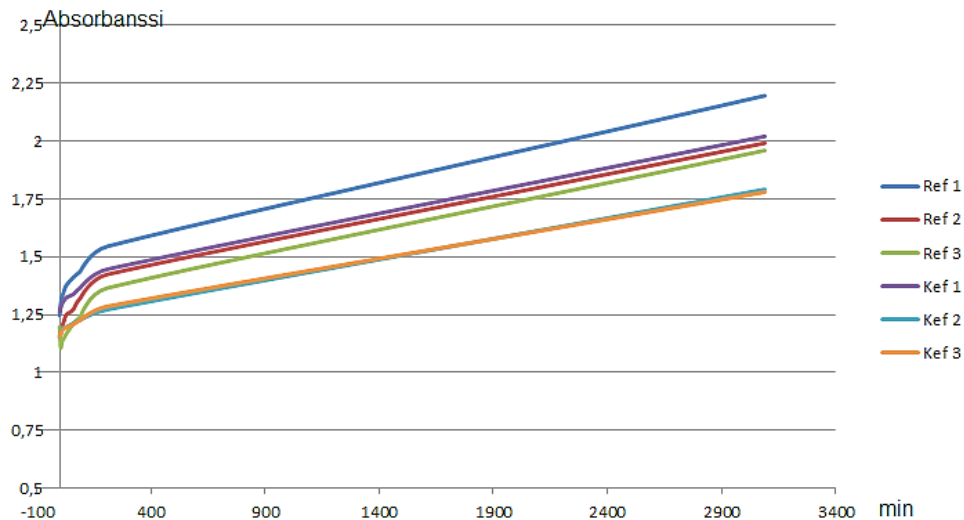


Kuva 20. kohdassa 1–3 referenssit ja 4–6 kefiirinäytteet ennen valokokeen alkua.



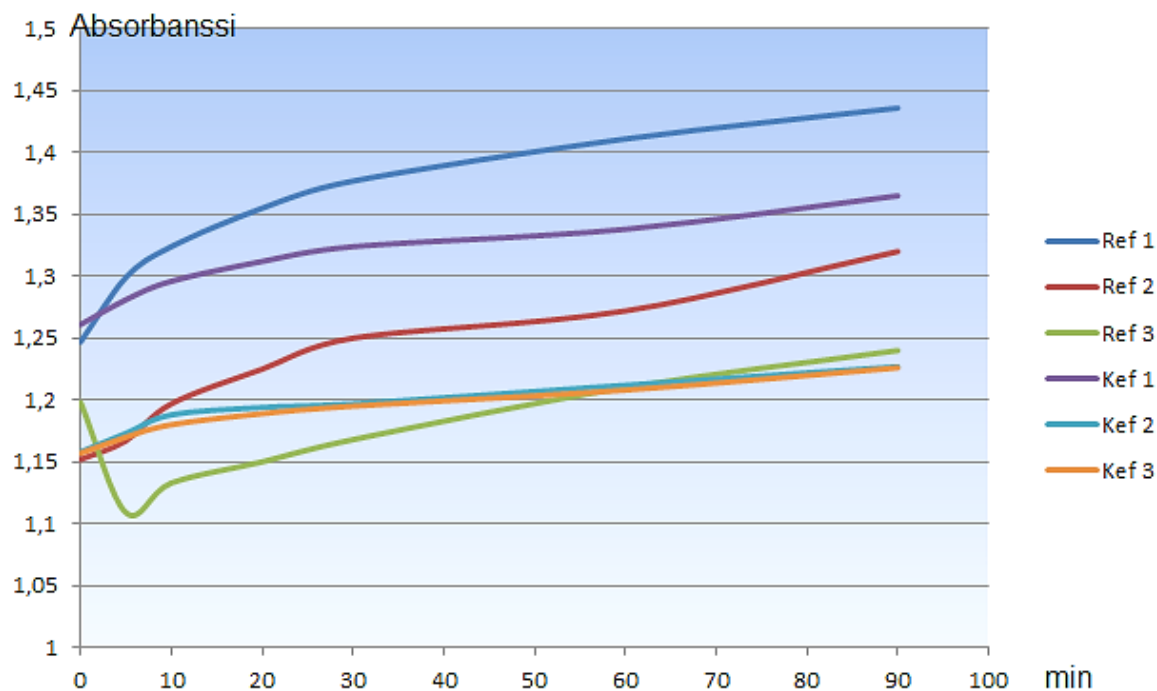
Kuva 21. Kefiirinäyte kyvetissä.

Kuvassa 20 nähdään kefiirinäytteiden sekä referenssien silmämääräinen väri. Kuvassa näytteet ovat minisentrifugiputkissa valmiina valokokeen alkuun. Kuvassa 21 näytteet taas ovat kyveteissä, joissa näytteet laitettiin spektrofotometriin absorbanssimittausta varten. Spektrofotometri säteilyttää kyvetissä olevaa näytettä aallonpituudella 520nm ja näytteen läpi mennyt säteilyn (valon) määrä mitataan valodetektorilla, jolloin signaali on suoraan verrannollinen valointensiteettiin. Kuvassa 21 näkyvä näyte on ollut jo valokokeissa kuvan otto aikana, ja värisävyn muutosta on nähtävissä kuvaan 20 nähden. Näyte ei ole niin punertava valokokeiden jälkeen.



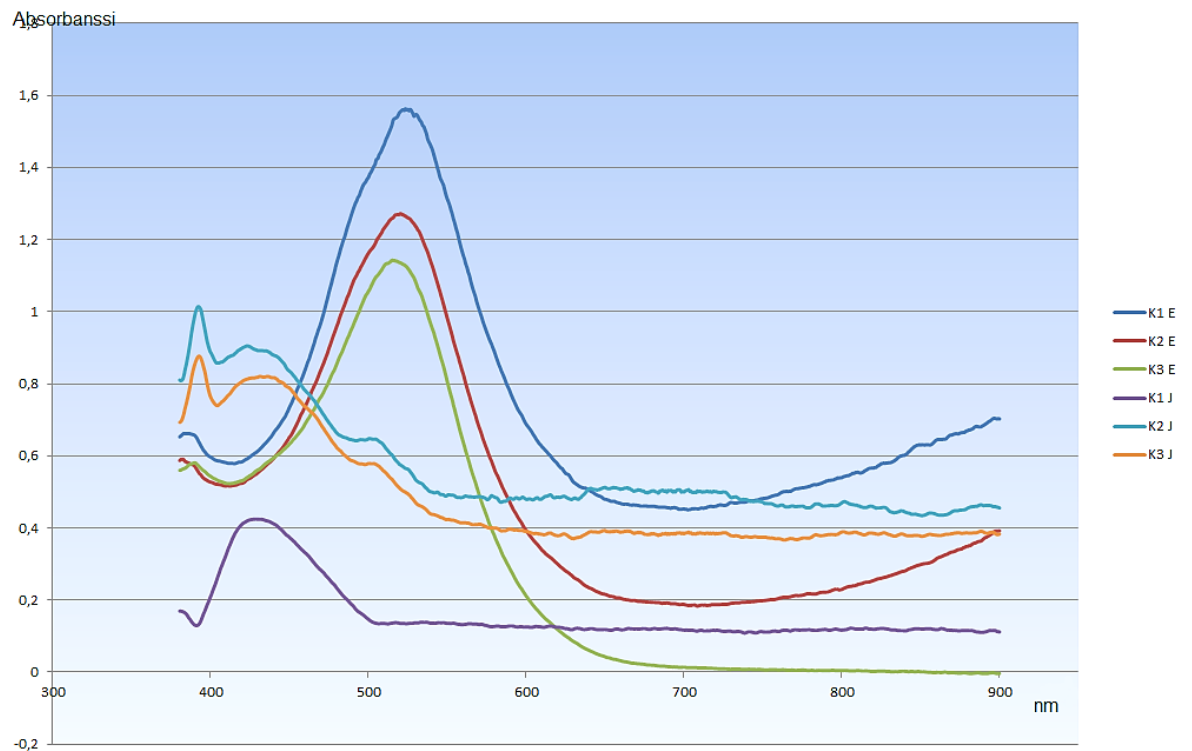
Kuvio 18. Absorbanssimuutokset näytteissä valokokeen aikana.

Kuviossa 18 näytetään referenssien ja kefiirinäytteiden absorbanssimuutosta valokokeen aikana. Näytteet olivat valokokeessa yhteensä 3090 minuuttia. Kuvaajassa esitetään näytteiden absorbanssimuutosta aallonpituudella 520nm verrattuna x-akselin aikaan. Koko valokokeen aikana kaikkien näytteiden absorbanssiarvo nousi, varsinkin valokokeen loppuaikana olleessa kahden päivän valolle altistuksessa. Näin ollen tehtiin erillinen kuvaaja valokokeesta aikaväliltä 0–90 minuuttia, jotta saadaan selvempi käsitys valokokeen alusta, sillä kahden päivän valokokeen (90–3050 minuuttia) näytteiden stabiiliteetin kasvun voinee selittää näytteiden hyytelöitymisen aiheuttava intensiteetin kasvu. Näytteistä haihtui tai hyytelöityi nestettä valokokeen loppupuoliskolla tuntemattomasta syystä, mikä voinee aiheuttaa virheitä tuloksiin. Lisää virhearviomahdollisuuksia esitetään kappaleessa 6.



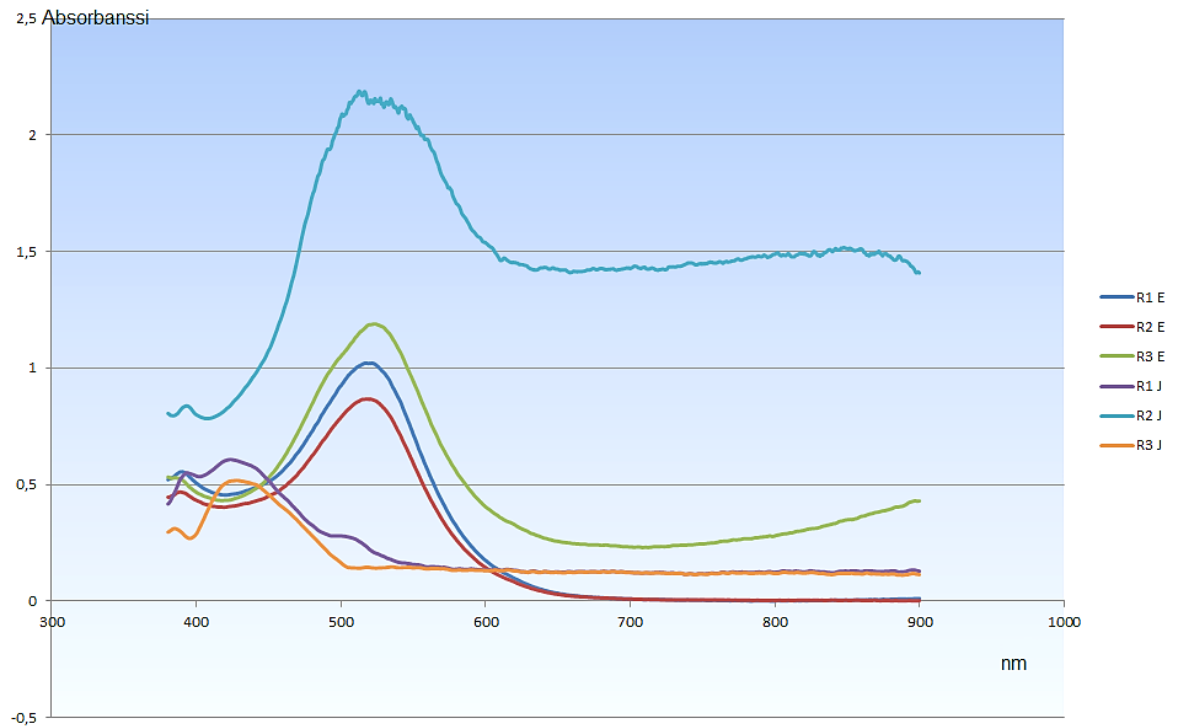
Kuvio 19. Referenssi- ja kefiirinäytteiden absorbanssimuutokset valokokeen aikana.

Kuviossa 19 nähdään referenssien ja kefiirinäytteiden absorbanssimuutokset valokokeessa 0–90 minuutin aikana. Kaikissa muissa näytteissä paitsi referenssi 3:ssa absorbanssi nousi. Referenssi 3 näytteessä absorbanssi laski huomattavasti ennen kymmenen minuutin kohtaa, mutta lähti nousuun noin 8 minuutin kohdalla. Intensiteetin kasvu näytteissä ei ollut odotettu ilmiö, eivätkä nämä spektrofotometrillä otetut arvot korreloi Vernier-laitteiston spektrien kanssa.



Kuvio 20. Kefiirinäytteiden K1–K3 spektrit ennen valokoetta sekä valokokeen jälkeen.

Kuviossa 20 esitetään kefiirinäytteiden K1–K3 spektrit ennen valokoetta (K1–K3 E) sekä valokokeen jälkeen (K1–K3 J). Y-akselilla nähdään absorbanssi ja x-akselilla aallonpituus (nm). Ennen valokoetta otetuissa spektreissä kaikilla näytteillä oli hyvin yhtenevät käyrät. Valokokeen jälkeen kefiirinäyte K1 näyttäisi menettäneen punaisen värinsä, sillä huippukohta on muuttunut ruskean värin aallonpituudelle 420–460nm. Tämä alue on käyrän ainoa huippukohta, ja viittaisi vahvasti värin hajoamiseen valokokeen aikana. Myös näytteiden K2 ja K3 käyrissä on valokokeen jälkeen muutosta 420nm alueella, mutta huippukohta on kuitenkin aallonpituudella 390nm, joka on keltavihreää väriä esittävällä alueella. Näissä käyrissä on myös vielä pieni kohouma 520nm alueella, eli ne näyttäisivät selvinneen hieman paremmin valokokeesta. Spektreillä saadut tulokset ovat yhteneviä kirjallisuuslähteiden asettamien ennakkopäätelmien kanssa. Hendry (1996, 262,59) kirjoittaa antosyaanien olevan epästabiileja joutuessaan UV- tai näkyvälle valolle alttiiksi. Hän myös mainitsee teoksessaan että myös hapettuminen aiheuttaa värin hajoamista.



Kuvio 21. Referenssien (R1–R3) spektrit ennen valokoetta ja valokokeen jälkeen.

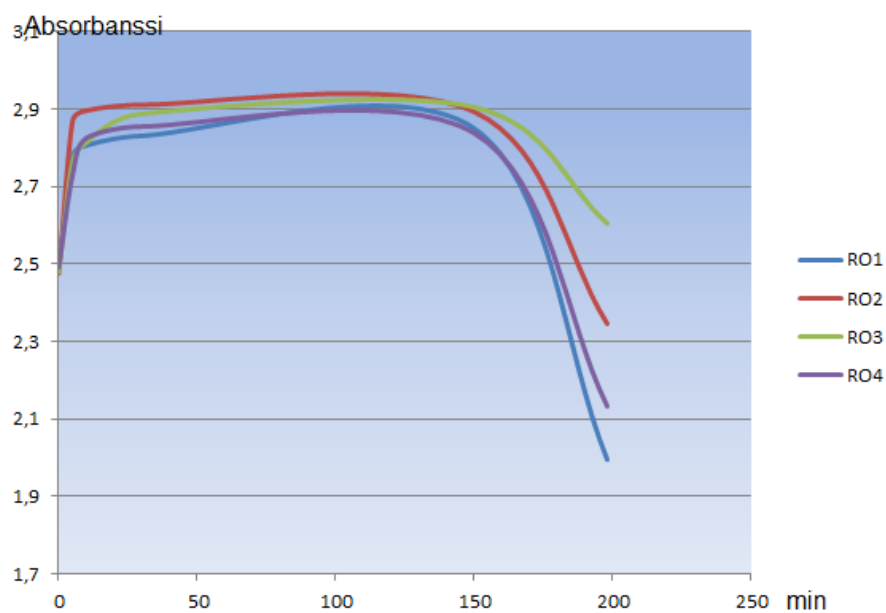
Kuviossa 21 nähdään referenssinäytteiden R1–R3 spektrit ennen valokoetta (R1–R3 E-kuvaajat) sekä valokokeen jälkeen (R1–R3 J-kuvaajat). Y-akselilla näkyy absorbanssi ja x-akselilla aallonpituus. Referenssien kuvaajat olivat yhtenevät ennen valokoetta, huippukohdan ollessa 520nm alueella. Valokokeen jälkeen referenssi näytteet R1 ja R3 olivat melko yhtenevät, molempien kuvaajien huippukohtien ollessa 420–460nm aallonpituudella. Tämä tarkoittaisi punaisen värisävyyn hajoamista ruskeampaan väriin. R1 näytteessä on myös pieni käyrä 500nm alueella, eli siinä vaikuttaisi olevan hieman enemmän punertavaa väriä valokokeen jälkeen kuin R3 näytteessä. R2 näytteen absorbanssi taas kasvoi 500nm–520nm aallonpituudella huomattavasti, mikä tarkoittanee punaisen värin intensiteetin kasvua, sillä tällä aallonpituudella näytteiden pitäisi absorboida punaista väriä. Kaikissa näytteissä on myös pieni huippu 380–400nm aallonpituudella, joka viittaisi värin kellertymiseen. R2 näytteellä on myös omituista nousua aallonpituudella 700–800nm mikä on näkyvän valon spektrin ulkopuolella. Syytä tälle ilmiölle ei ole tiedossa.

Referenssinäytteiden käyrät ennen valokoetta olivat yhtenevät kefiirinäytteiden käyrien kanssa. Valokokeen jälkeen suurimmat erot referenssien ja

kefiirinäytteiden välillä olivat Referenssi näyte R2:n absorbanssin kasvu, sekä R1 ja R3 näytteiden 420–460nm aallonpituudella olevat ainoat huippukohdat. Tämä näyttää että referensseistä kaksi näytettä kolmesta menetti punaisen väriaineensa. Kefiirinäytteistä K1 näyte reagoi referenssien kanssa yhtenevästi. Näytteen K2 ja K3 omasivat huomattavasti korkeammat absorbanssit, mutta huippukohdat olivat myös näissä vaihtuneet 520nm alueelta pois aallonpituudelle 380nm. Kuitenkin käyrissä oli myös 500–520nm aallonpituudella selvä kohouma.

4.5 *Rhizopus oligosporus* fermentointi

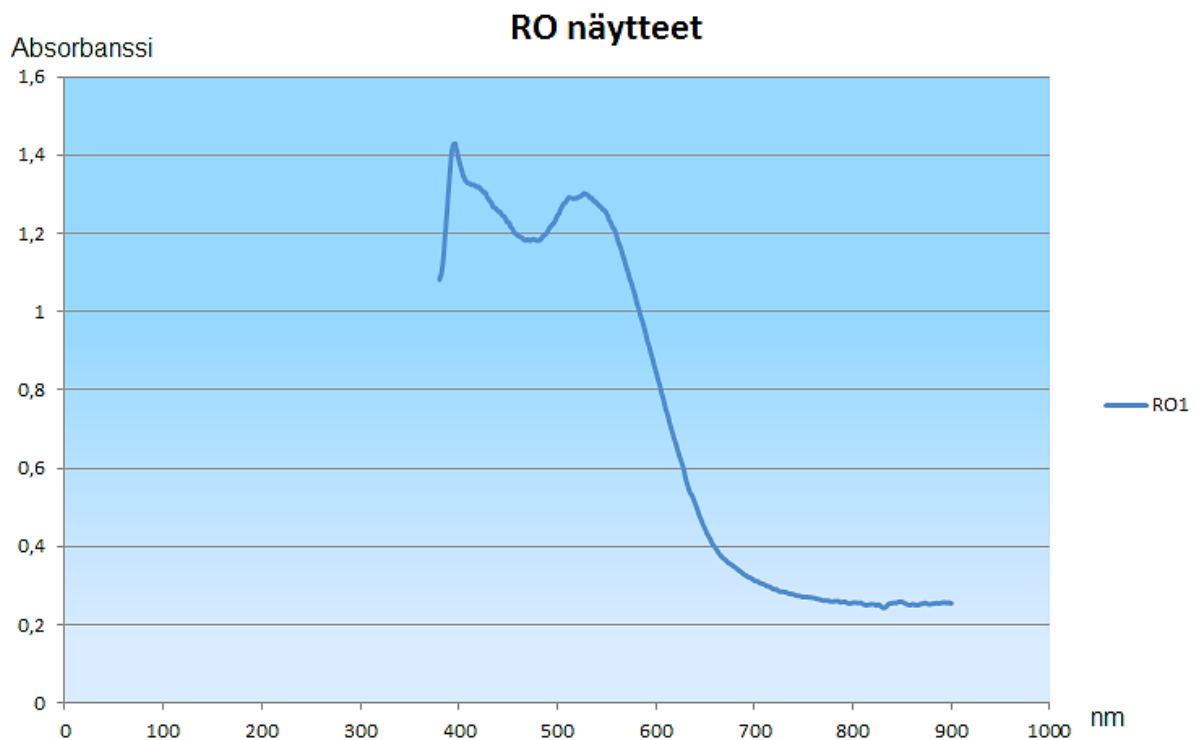
Rhizopus oligosporus -itiöjauheella fermentoidusta kaurahiutale-marjamurskasta saadusta mehusta saatiin myös tuloksiin Vernier-laitteistolla spektrit sekä absorbanssi muutokset. Kaikki neljä näytettä RO1–RO4 on otettu ensimmäisestä fermentointi erästä, jossa oli paras mehunsaanto. Näytteitä ei ole laimennettu vaan ne ovat 100% näytettä.



Kuvio 22. Itiöfermentoinnin absorbanssiarvot valokokeen aikana.

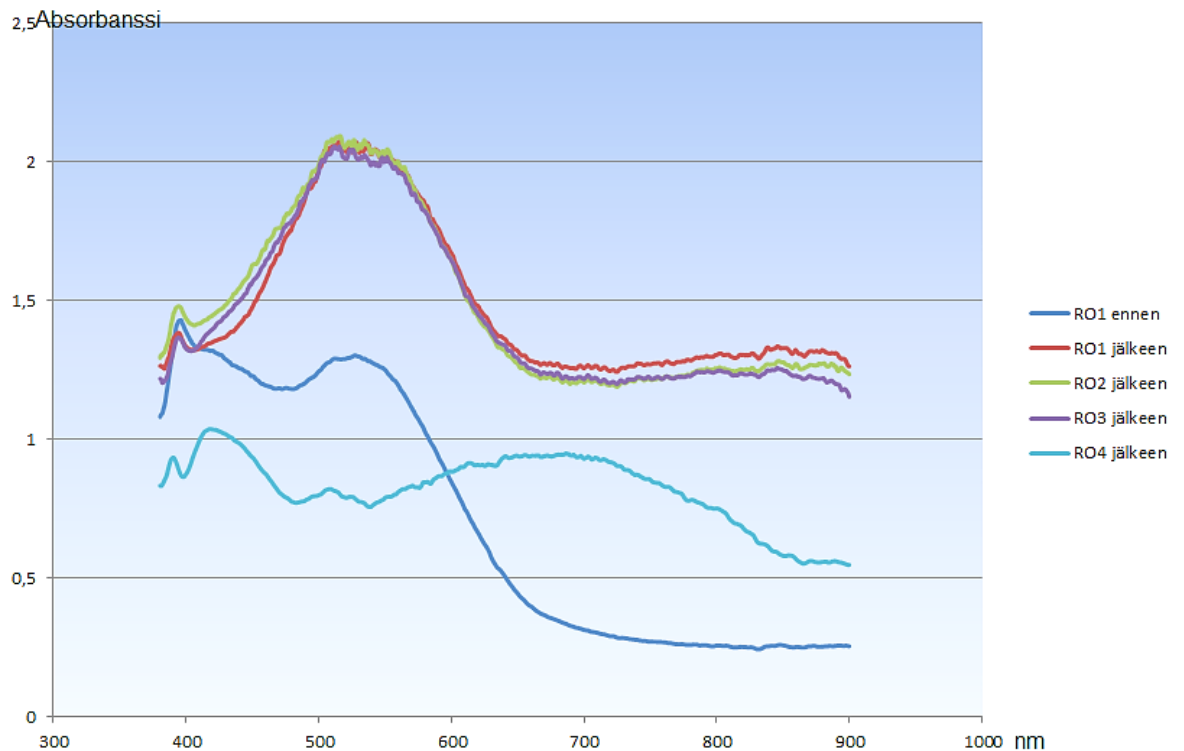
Kuvaajassa (kuvio 22) esitetään näytteiden absorbanssin kehitystä valokokeen aikana. Näytteet olivat valokokeessa yhteensä 198 minuuttia, jonka aikana mitattiin absorbanssi arvoja 520nm aallonpituudella. Saaduista tuloksista piirrettiin kuvaaja havainnollistamaan stabiliteettia. Kaikki näytteet reagoivat yhtenevästi

absorbanssin noustessa valokokeen alussa, pysyen hyvin stabiilisenä noin 5–150 minuutin välillä. Kaikki näytteet kuitenkin menettivät stabiilisuuttaan 150 minuutin jälkeen absorbanssiarvojen laskiessa huomattavasti. Sienifermentoinnilla saadut näytteet erosivat huomattavasti muista näyte-eristä, joissa näytteet pääsääntöisesti kasvattivat intensiteettiään valokokeen loppua kohden. Lienee siis mahdollista että sienifermentointi muuttaa värin kemiallista rakennetta muista näytteistä eroavaksi. Nämä näytteet eivät myöskään hyytelöityneet niin paljon kuin muilla käsittelyillä saadut näytteet, joten väriaineessa lienee vähemmän pektiiniä. Väriaineiden kemiallisten erojen tutkimuksella varmasti saataisiin selitykset tulosten erilaisuuteen.



Kuvio 23. RO näytteet ennen valokoetta.

Ennen valokoetta otettuihin spektreihin liitettiin vain yksi käyrä, sillä näytteiden käyrät olivat identtisiä, niiden ollessa laimentamattomia ja täysin samasta näytteestä. Kuviossa 23 nähdään RO-näytteiden spektrikuvaaja. Näytteiden spektrissä huippukohta oli aallonpituudella 400nm. Toinen vain vähän matalampiabsorbinen huippukohta oli 520nm alueella. Mielenkiintoista on, että näytteiden väri oli huomattavasti violetimpi (kuva 22) kuin muiden näyte-erien, mutta spektrin huippukohdat olivat kuitenkin keltavihreän ja punaisen värin alueilla.



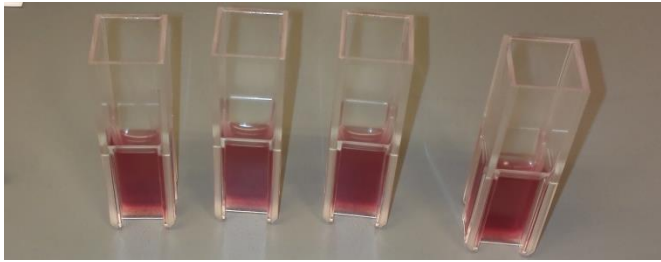
Kuvio 24. RO-näytteiden absorbanssin muutokset valokokeen aikana eri aallonpituuksilla.

Kuviossa 24 esitetään, RO, eli sienifermentointinäytteiden absorbanssimuutoksia eri aallonpituuksilla ennen ja jälkeen valokokeen. Ennen valokoetta näytteet olivat täysin samanlaisia, joten otettiin vain RO1 näytteen spektri esittämään valokoetta ennen otettuja spektrejä.

Ennen valokoetta näytteiden spektrien huippukohta oli 400nm alueella, kun taas valokokeen jälkeen näytteiden RO1–RO3 huippukohta on aallonpituuden 500nm paikkeilla. Näytteiden kuvaajat ovat hyvin yhteneviä ja näytteissä nähdään yhä pieni huippu 400nm aallonpituudella. RO4 näytteen huippukohta oli valokokeen jälkeen aallonpituudella 420nm, joka voisi kuvastaa antosyaanien muuttumista värisävyiltä ruskeiksi, eli värin hajoamista. Näytteessä RO4 on myös huippukohdat aallonpituudella 380nm ja aallonpituudella 520nm. Myös aallonpituudella 700nm on loivaa huippua, mikä viittaisi sinivihreään väriin.

Näytteiden silmämääräinen väri oli suodatuksesta lähtien hyvin erilainen kuin liuotus- ja kefiirifermentointitöissä. Niiden värin ollessa selvästi punertava, RO näytteet olivat enemmän sinertäviä, kuvassa 22 voidaan nähdä näytteiden väri,

joka on hieman violettia sävyttävä. Sinertävyys voinee johtua muita näytteitä korkeammasta pH:sta sienifermentoidun mehun pH:n ollessa 5,6.



Kuva 22. RO-näytteet kyveteissä.

4.6 Kivennäisvesisovellus

Tehtiin sovellus jossa värjättiin kivennäisvettä tutkimuksessa tehdyillä väriaineilla. Työssä tehtiin kaksi vertailusarjaa, ensimmäisessä värjättiin kivennäisvettä värillä jota saatiin kokonaisista marjoista liottamalla sekä murskatuista marjoista liottamalla saatua väriä. Toisessa erässä verrattiin onnistuneesta kefiiri-fermentoinnista, eli fermentointi 3:sta, saatua väriainetta sekä sen rinnakkais-referenssiä, kiehutettua kefiirinäyte 3:sta. Käytetyt väriaineet olivat olleet huoneen lämmössä foliolla peitettynä kaksi vuorokautta tutkimuksen aloitushetkellä.

Näytteessä käytettiin Novelle merkkistä kivennäisvettä, jonka sisältö löytyy kuvasta 23.



Kuva 23. Työssä käytetyn kivennäisveden sisällysluettelo.

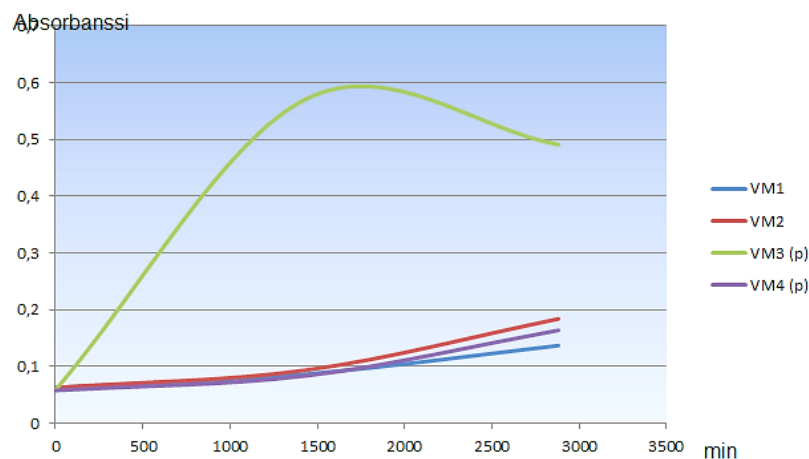
4.6.1 Kivennäisveden värjäys liotusmenetelmällä saaduilla väreillä

Mitattiin kahteen dekanterilasiin 0,5 dl Novellen kivennäisvettä. Toiseen lisättiin 2 ml aiemmissa tutkimuksissa käytetystä marjamurskasta liotettua väriä ja toiseen 2 ml kokonaisista marjoista liotettua väriä. Marjamurska-värin ja kivennäisveden sekoitukselle annettiin nimeksi VM ja siitä pipetoitiin neljä yhden millilitran näytettä minisentrifugiputkiin. VM näyte oli silmämääräisesti vaaleanpunertava kun taas kokonaisesta marjasta ja kivennäisvedestä tehty sekoitus, näyte VK, oli selvästi sinertävämpi, kuten kuvasta 24 voidaan nähdä.



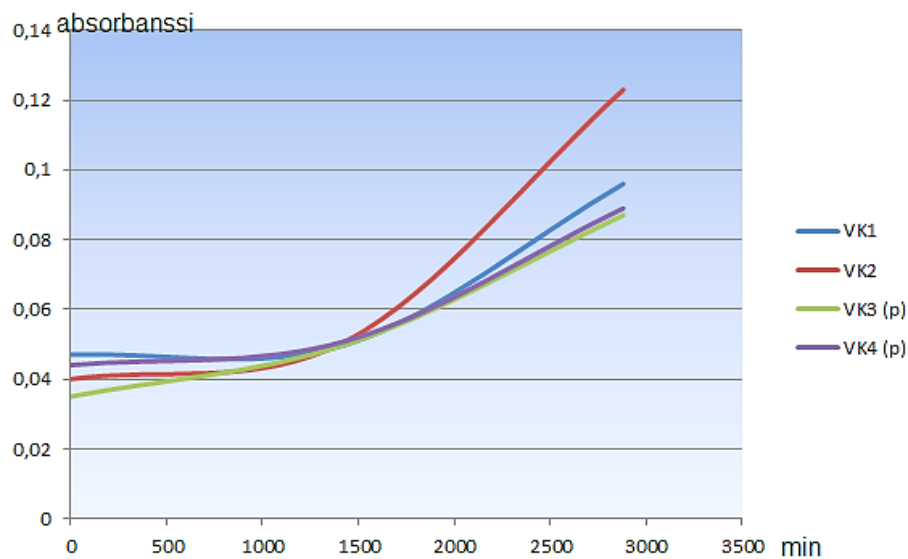
Kuva 24. Kivennäisveden värjäys liotetuista marjoista saaduilla väreillä. Vasemmalla VM, oikealla VK näyte.

Näytteet VM1–2 sekä VK1–2 altistettiin valokokeelle, jossa näytteet olivat 48 tuntia samaisessa valokokeessa kuin aiemmatkin näytteet. Näytteet VM3–4 sekä VK3–4 taas olivat vertailun vuoksi pimeässä 48 tuntia. Pimeässä olevat näytteet olivat kääritty folioon, jotta valoa ei pääsisi näytteisiin.



Kuvio 25. Valokokeen aikainen absorbanssimuutos VM-näytteissä.

Kuviossa 25 esitetään VM-näytteiden, eli murskatuista marjoista saadulla mehulla värjättyjen vichynäytteiden, absorbanssimuutosta (y-akselilla) aikaan verrattuna (x-akselilla). Näytteet olivat valokokeessa kaksi vuorokautta eli 2880 minuuttia. Näytteet VM1–2 olivat valokokeessa, kun taas näytteet VM3–4 olivat foliolla peitettynä pimeässä. Valokokeessa olleiden näytteiden absorbanssi nousi tasaisesti valokokeen loppua kohde, samoin kuin pimeässä säilytetty vertailunäyte VM4. Pimeässä säilytetty näyte VM3 taas kasvatti intensiteettiään ensimmäisen vuorokauden, eli 1440 minuutin ajan, kunnes intensiteetti alkoi hitaammin laskea 2000 minuutin jälkeen. Mielenkiintoista, kuinka erilaisesti tämä näyte reagoi verrattuna toiseen pimeä säilytykseen, sekä valokokeessa olleisiin näytteisiin. Mahdollista on että näytteessä on tapahtunut joitain kemiallisia muutoksia, jotka vaikuttavat värin stabiiliteettiin.



Kuvio 26. Valokokeen aikainen absorbanssimuutos VK-näytteissä.

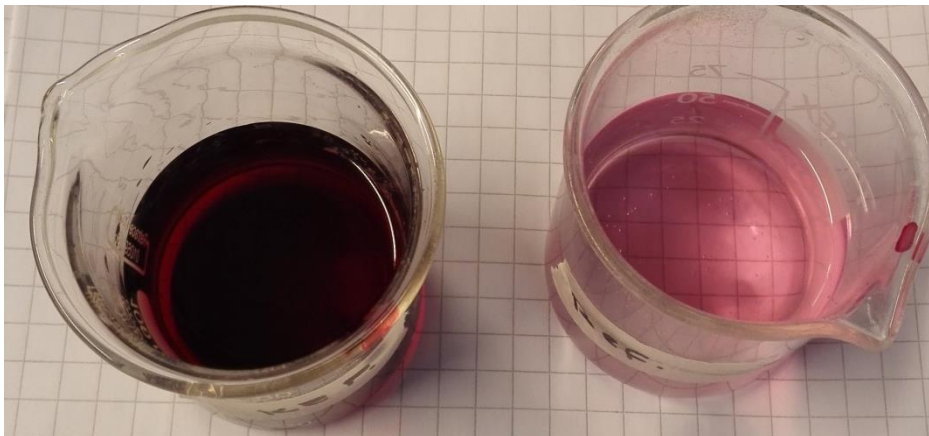
Aallonpituudella 520nm mitatut absorbanssit kokonaisesta marjasta liuotetulla mehulla värjätystä vichynäytteistä, VK1–4, voidaan nähdä kuviossa 26. Näytteitä VK1–2 pidettiin valokokeessa kaksi vuorokautta, kun taas näytteet VK3–4 olivat vertailun vuoksi pimeäsäilytyksessä, eli foliokääreessä. Kuvaajassa nähdään kaikkien näytteiden intensiteetin kasvaneen, valokokeessa olleilla näytteillä kasvu oli jyrkempi kuin pimeässä säilytetyillä. Intensiivisyyden kasvu valokokeen aikana voinee johtua hyttelöitymisestä tai haihtumisesta. Näytteet olivat kannellisissa

minisentrifugiputkissa valokokeen aikana, kuten muissakin valokokeissa. Spektrofotometrillä mitatessa näytteet olivat avonaisissa kyveteissä, joten haihtumisen ei pitäisi olla kovin uskottava vaihtoehto.

Tutkimuksen perusteella murskatusta marjasta saadulla värillä värjättyjen näytteiden pimeäsäilytyksessä ja valosäilytyksessä voi olla eroja stabiliteetissa, sillä näyte VM3 eroaa muista VM-näytteistä. Kokonaisesta marjasta liotetulla värillä arvot pimeässä ja valossa olivat lähes identtiset. Murskatusta marjasta saatu väriaine vaikuttaisi stabiilimmalta, sillä muutokset eivät ole niin suuria kuin kokonaisesta marjasta saadussa väriaineessa.

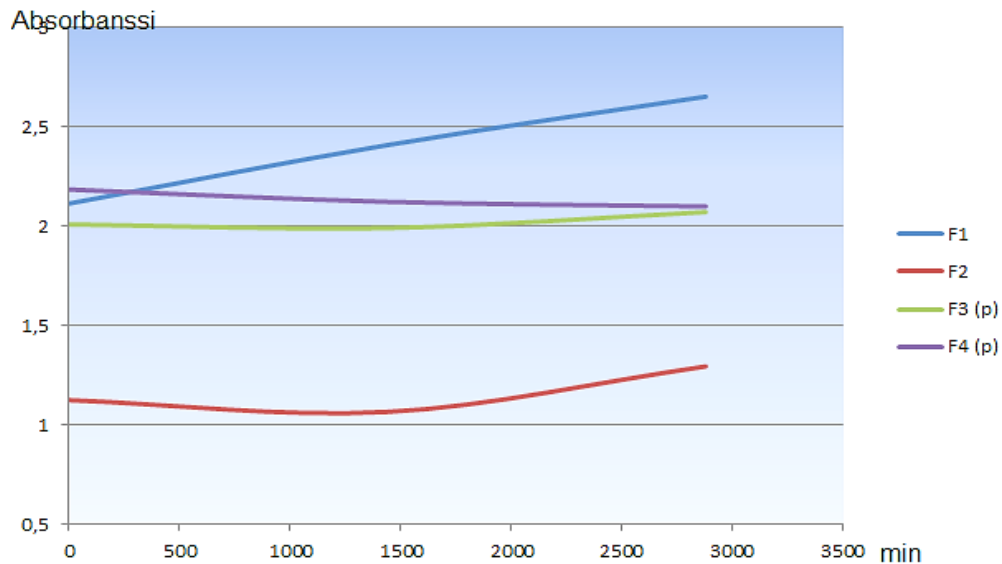
4.6.2 Kivennäisveden värjäys kefiiri- ja referenssi väriaineilla

Mitattiin kahteen 100ml dekanterilasiin 0,5 dl Novelle kivennäisvettä. Värjätään toisessa dekanterilasissa olevaa vichyä onnistuneella kefiirifermentoinnilla saadulla värillä (Näyte-erä F) ja toista referenssi 3:sta saadulla värillä (Näyte-erä R). Kuvassa 25 nähdään näiden väriaineiden ero. Molemmissa dekanterilaseissa on 0,5 dl kivennäisvettä sekä 1 ml väriainetta. Fermentoinnilla saatu väriaine on referenssiä huomattavasti voimakkaampi.



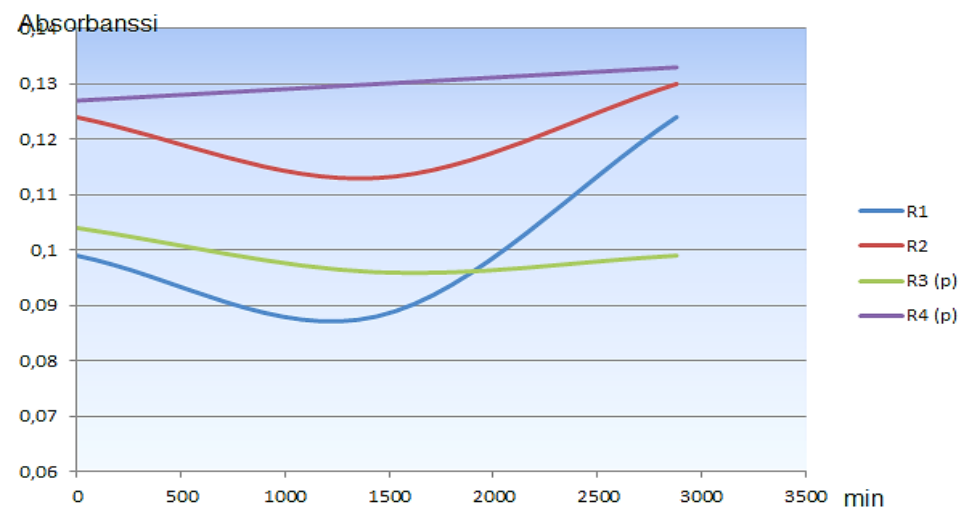
Kuva 25. Vasemmalla kefiirifermentoinnilla saadulla väriaineella värjättyä kivennäisvettä, oikealla referenssi väriaineella värjättyä kivennäisvettä.

Pipetoitiin molemmista näytteistä neljä 1 ml näytettä minisentrifugiputkiin. Molemmista eristä otetaan kaksi näytettä valokokeeseen ja kaksi näytettä pimeä säilytykseen.



Kuvio 27. Kefiirinäytteillä värjätyн kivennäisveden absorbanssi-arvoja valokokeen aikana.

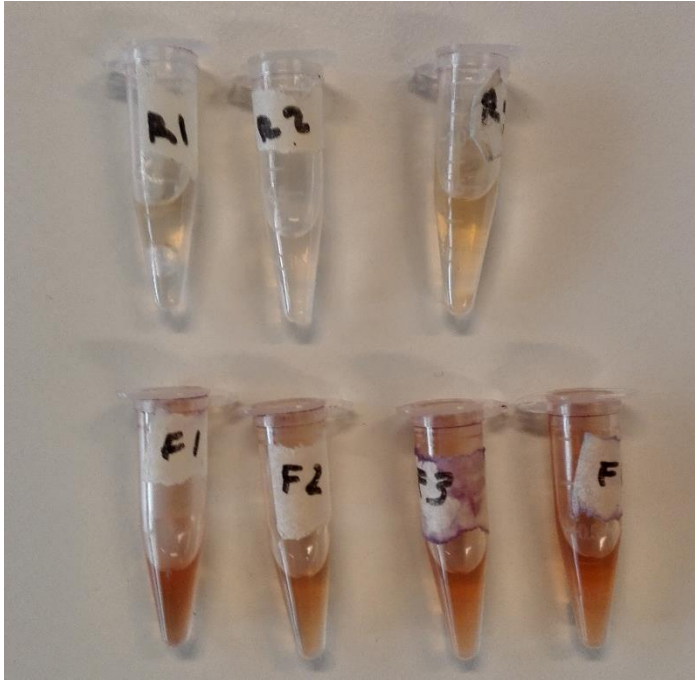
Kuviossa 27 esitetään kefiirinäytteillä värjätyн kivennäisveden stabiilisuutta valo- ja pimeäsäilytyksessä. Näytteet olivat 48 tuntia eli 2880 minuuttia valokokeessa. Pimeässä säilytetyt näytteet ovat tutkimuksen perusteella huomattavasti stabiilimpia kuin valokokeessa olleet rinnakkaisnäytteet. Valokokeessa olleiden näytteiden absorbanssilukemat nousivat, vaikka niiden olettaisi laskevan valokokeen aikana. Syynä lienee näytteiden hyttelöityminen, mahdollinen nestemäärän menetys kokeen aikana tai mahdolliset kemialliset reaktiot. Pimeässä säilytetyt näytteet säilyttivät melko tasaisen stabiiliteetin kokeen aikana.



Kuvio 28. Referenssinäytteellä värjätyн kivennäisveden absorbanssi-arvoja valokokeen aikana.

Kuviossa 28 nähdään referenssi näytteiden osalta samaisen valokokeen tulokset. Referenssinäytteet olivat myös 48 tuntia eli 2880 minuuttia valokokeessa. Näytteet R1–2 olivat valolle altistettuina ja R3–4 olivat pimeäsäilytyksessä. Referenssinäytteillä absorbanssimuutokset ovat huomattavasti pienemmässä mittakaavassa luvullisesti, mutta käyrien ilmaisemana muutokset ovat suurempia kuin vastaavissa kefiirinäytteissä. Valokokeessa olleet referenssinäytteet olivat menettäneet absorbanssiaan ensimmäisen vuorokauden, eli 1440 minuutin, aikana huomattavasti. Tämän jälkeen absorbanssiarvo kasvaa valokokeen loppuun asti. Absorbanssin nousulle ei ole suoranaista syytä, mutta luultavasti tuloksella on jotain tekemistä valokokeessa tapahtuvien muutosten kanssa, sillä pimeässä säilytetyt näytteet eivät reagoineet näin radikaalisti. Pimeässä säilytetyt näytteet olivat hieman paremmin stabiileja, sillä käyrien muutokset eivät ole niin näkyviä kuin valokokeessa olleiden näytteiden. Kuitenkin pimeässä säilytetyn R3–näytteen kuvaaja muuttui hyvin samantyyppisesti valokokeessa olleisiin näytteisiin nähden. Näytteen–R4 absorbanssiarvot taas kasvoivat hiljalleen pimeäsäilytyksen aikana. On myös mahdollista että näytteissä tapahtui joitain kemiallisia reaktioita eri ainesosien kesken tai hapen saannin seurauksena.

Tämän tutkimuksen perusteella kefiirinäytteet vaikuttaisivat tasaisemmin reagoivilta, ja pimeäsäilytyksen osalta huomattavasti paremmin säilyviä. Kefiirinäytteissä muutokset olivat lukemiltaan suurempia, mutta käyrät olivat huomattavasti tasaisempia, joten näytteet vaikuttaisivat olevan stabiilimpia kuin referenssinäytteet. Myös viiden kuukauden ajan pimeässä säilytetyt näytteet vahvistaisivat tämän oletuksen. Alla olevassa kuvassa 26 nähdään viisi kuukautta pimeässä vaatehuoneessa säilytettyjen referenssi- ja kefiirinäytteiden silmämääräiset värierot.



Kuva 26. Referenssi- ja kefiirinäytteet viiden kuukauden pimeäsäilytyksen jälkeen.

Kuvassa 26 vasemmalla puolella kaksi näytettä R1–2 ja F1–2 ovat valokokeessa käyneet näytteet ja oikeanpuoleiset näytteet R3 ja F3–4 ovat pimeäsäilytyksessä olleet näytteet. Silmämääräiset värierot ovat varsin huomattavia ja kefiirinäytteiden huomataankin pitäneen värinsä paremmin. Referenssit 1–2 ovat lähes värittömiä ja valokokeen aikana pimeässä säilytetty R3 on myös haalentunut erittäin voimakkaasti. Kefiirinäytteissä ei huomata suuria eroja valokokeessa ja pimeäsäilytyksessä olleiden näytteiden välillä, vaan näytteet vaikuttavat säilyttäneen värinsä yhtäläisesti.

4.6.3 Kefiirinäytteestä ja referenssistä saadun värin voimakkuuden vertailu

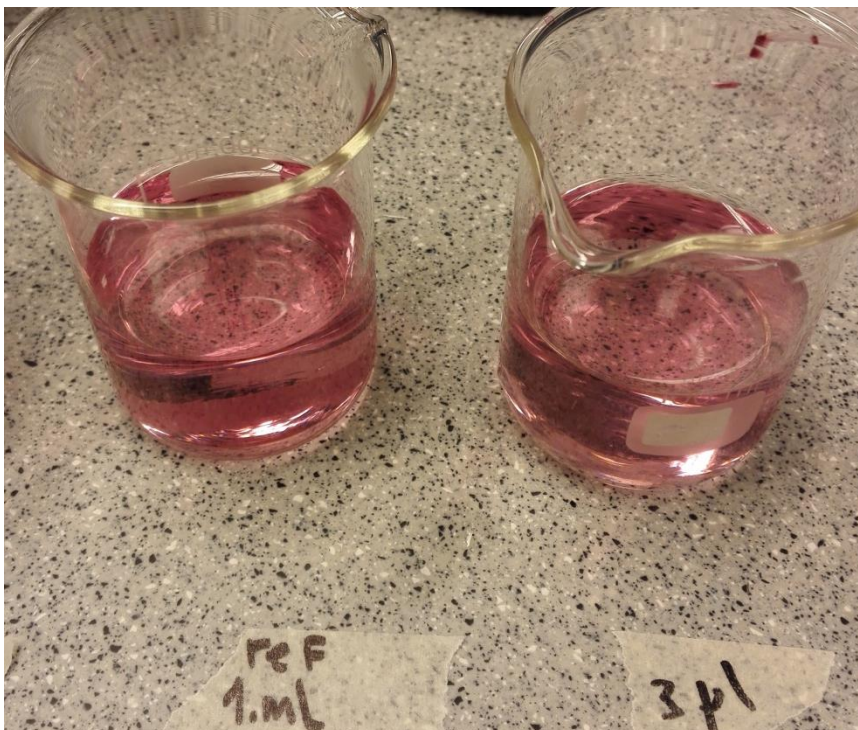
Päätettiin tutkia kuinka paljon vähemmän kefiirifermentoinnilla saatua väriä tarvitaan värjäämään samanvahvuinen väri kuin mitä kiehutetulla kefiiri-referenssillä saatiin. Mitattiin kahteen dekanterilasiin 50 ml kivennäisvettä. Toiseen dekanterilasiin lisättiin 1ml referenssinäytteestä saatua väriä. Mitattiin referenssin absorbanssiksi 520nm aallonpituudella 0,11. Sen jälkeen toiseen dekanterilasiin lisättiin 100 mikrolitra kefiirinäytteen väriä. Sen absorbanssiksi mitattiin 0,03. Lisättiin kaksi mikrolitraa lisää väriä jolloin absorbanssimittauksessa

saatiin 0,13. Arvot olivat niin lähellä toisiaan että voitiin todeta että 300 mikrolitraa kefiiriväriä vastaa 1ml referenssiväriä värjäystehonsa puolesta.

Taulukko 6. Kivennäisveren värjäys vertailussa kivennäisveteen lisätyt väriaine määrät.

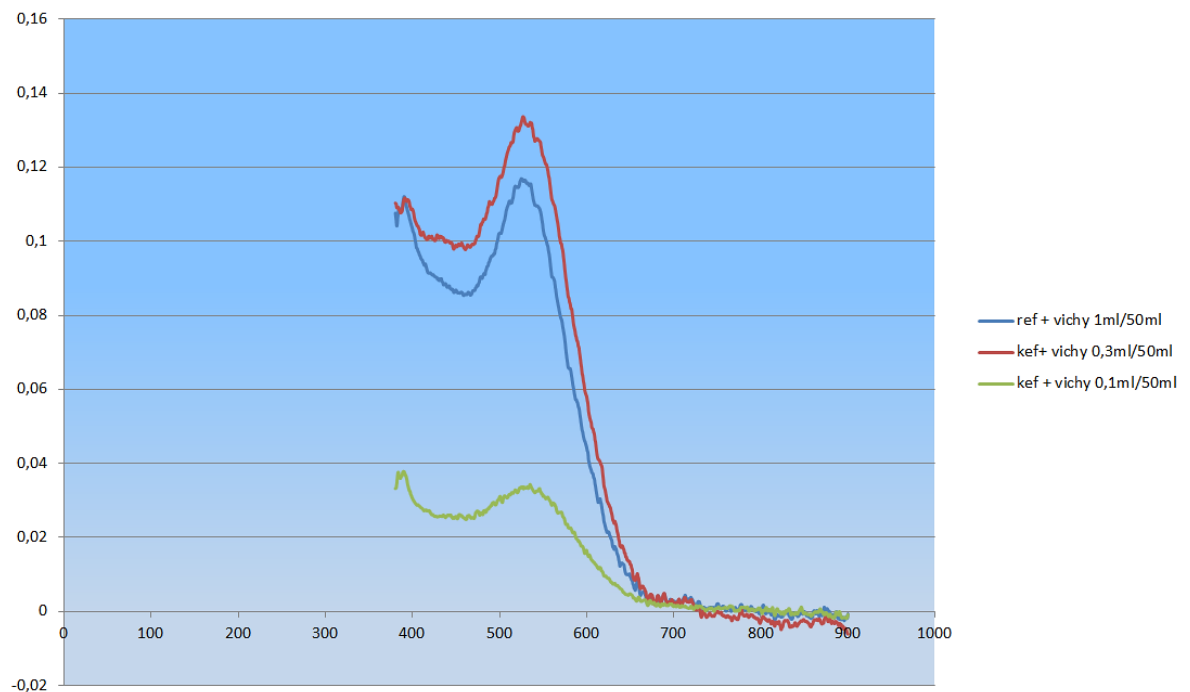
50ml		
Kivennäisvettä		520 nm
	lisäty väri	absorb.
REF1	1ml	1,11
KF	0,1ml	0,03
KF	0,3ml	0,13

Taulukossa 6 esitetään kivennäisveteen lisätyt väriaineet sekä värjätystä näytteistä mitatut absorbanssi-arvot. Kuvassa 27 nähdään referenssinäytteen sekä kefiirinäytteen silmämääräiset värit. Vasemmalla olevassa referenssinäytteessä on 50ml kivennäisvettä ja 1 ml referenssiväriainetta, kun taas oikealla olevassa kefiirinäytteessä on 50 ml kivennäisvettä ja 0,3 ml kefiirifermentoinnilla saatua väriainetta.



Kuva 27. Referenssin ja fermentoidun väriaineen vertailu. Vasemmalla puolella on referenssinäytteellä värjätty näyte ja oikealla fermentoidulla kefiirinäytteellä värjätty näyte.

Tulosten perusteella kefiirifermentoidun marjamehun värjäysteho vaikuttaisi olevan varsin hyvä referenssiin verrattuna. Kefiirifermentoinnilla aikaansaatua väriainetta tarvitsee laittaa alle kolmannes referenssiin verrattuna. Kuviossa 29 nähdään näytteiden spektrit, jotka on otettu Vernier-laitteistolla. Spektreistä voidaan nähdä väriaineiden olevan hyvin samankaltaisia käyrien puolesta. Kefiirinäytteessä on hieman korkeampi absorbanssi, mutta käyrissä on yhtenevät huippukohdat aallonpituudella 400nm ja 520nm. Spektristä voidaan täten todeta väriaineilla olevan huippukohdat punaisena ja keltaisena näkyvillä alueilla. Kuvan 27 mukaisesti tämä vaikuttaisi olevan totta, sillä väriaineessa voidaan nähdä lievää kellertävyyttä punaisessa värissä.



Kuvio 29. Referenssi ja kefiirinäytteiden värjäystehon vertailuspektrit.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

5.1 Yhteenveto

Työn tarkoituksena oli luonnollisen punaisen väriaineen kehittäminen variksenmarjasta mahdollisimman helpolla metodilla. Mehupohjaisen väriaineen kehitys työssä vaikuttaa lupaavalta, mutta jatkotutkimuksia vaaditaan. Variksenmarjan makuprofiilin mainittiin useissa lähteissä olevan epämiellyttävä, joten varsinkin makuprofiilin vaikutusta tuotteeseen on tutkittava. Väriaineeksi variksenmarjasta kuitenkin on, ja varsinkin kefiirifermentoinnilla saatiin aikaan mielenkiintoisia tuloksia, värin ollessa hyvin voimakas. Stabiilisuutta pitää kuitenkin tutkia sekä löytää sopiva käyttösovellus väriaineelle. Varastoinnin vaikutusta tuotteeseen tulee tutkia, jotta saadaan selville sopiiko väriaine esimerkiksi työssä kokeiltuun kivennäisveden värjäykseen.

Rhizopus oligosporus -fermentoinnin osalta ei tullut aivan yhtä hyvää tulosta, sillä väriaineesta tuli enemmän violetti, kuin punainen. Varmuutta ei kuitenkaan ole, johtuiko värin sinertävyys liiasta kaurapitoisuudesta vai muuttiko vain korkeampi pH väriä. Tältäkin osin jatkotutkimuksia olisi mielenkiintoista tehdä. Myös sienifermentoinnin menetelmää tulisi parantaa ja kokeilla erilaisia reseptejä vähäisemmällä kauramäärällä.

Molemmat fermentoinnit irrottivat marjoista väriainetta paremmin, kuin pelkkä vesiliuotus. Myös fermentoinnilla saatujen väriaineiden stabiilisuus vaikutti olevan parempi kuin liuotusmenetelmällä saatujen värien. Kefiirifermentoinnilla saatu väriaine oli myös tutkimuksen perusteella voimakkaampi ja kestävämpi väriaine kuin referenssinsä.

5.2 Tulosten arviointi

Kefiirifermentoinnin voidaan tehtyjen tutkimusten perusteella sanoa parantavan mehunsaantoa. Kefiirifermentoinnilla saatiin myös väriaineeseen hyvä intensiivinen väri. Sieni-fermentoinnilla saatu väri taas oli melko sinertävä ja

violettiin vivahtava, eikä vastannut tutkimuksessa haettua punaista väriainetta. Menetelmää olisi kuitenkin hyvä tutkia, sillä menetelmällä voidaan kuitenkin saada mielenkiintoisia elintarvikevärejä.

Kefiiri ja referenssinäytteiden käyttäytyminen oli valokokeessa hyvin yhtenevää. Kefiirinäytteiden huippukohdat muuttuivat keltaisen tai ruskean värin alueelle. Antosyaaneille on ominaista absorboida ruskeaa väriä 420–460nm alueella, mikä kertoo antosyaanin värin hajoamisesta. Kefiirinäyte–1 omasi huippukohdan vain tällä ruskeaa väriä ilmaisevalla alueella valokokeen jälkeen. Kefiirinäytteillä 2–3 kuitenkin huippukohdat sijoittuvat aallonpituudelle 390nm, 420–460nm sekä 520nm. Näytteiden kolme huippukohtaa näkyivät keltaisen, ruskean sekä punaisen värin alueilla, keltaisella alueella näkyvän huipun ollessa korkein. Referensseistä r1–r3 näytteiden huippukohdat asettuivat myös ruskeaa väriä esittävälle 420–460nm aallonpituudelle. Näytteellä r1 oli myös 520nm alueella pieni huippu, sekä molemmissa näytteissä hyvin pieni huippukohta keltaisena näkyvällä alueella 390. Näytteen r2 huippukohta oli 520nm alueella, ja absorbanssiarvot olivat korkeat. Kuvaaja oli hyvin poikkeava, joten virheen mahdollisuus on olemassa, tai mahdollisesti referenssi r1 näyte saattoi parantaa väri-intensiivisyyttään valokokeen aikana. Myöskään näytteen hyytelöitymisen tuomaa virhemahdollisuutta ei voida pois sulkea, sillä näytteissä tapahtui eriasteista hyytelöitymistä, ehkä pektiinipitoisuudesta johtuen.

Niin kefiiri- kuin referenssinäytteetkin menettivät spektrien mukaan punaista väriään. Täytyy kuitenkin huomioida, että näytteiden pH oli melko korkea, eli pH 3,7 luokkaa. Antosyaanit menettävät stabiilisuuttaan pH 3:n jälkeen, joten tulokset olisivat voineet olla erityyppisiä matalammassa pH:ssa. Ainakin työssä tehdyissä pH-sarjoissa matalin pH 2,8 vaikutti stabiilimmalta kuin korkeammat pH näytteet. Myös pH 2,8 näyte vanhasta pH-sarjasta oli pitänyt värinsä melko hyvin, joten tulevaisuudessa kokeissa olisi hyvä tutkia matalia pH-arvoja. Vanhojen pH-sarjojen näytteiden vertailu uuteen pH-sarjaan antoi olettaa näytteiden vanhentumisen vaikuttavan stabiliteettiin. Vanhemmat pH-sarjan näytteet reagoivat huomattavasti vahvemmin valokokeeseen, kuin uusi sarja. Tuloksista voidaan olettaa vanhempien näytteiden reagoivan vahvemmin prosessointiin, eli väriaineen vanheneminen vaikuttaisi heikentävän prosessinkestokykyä näytteissä.

Kefiirifermentoinnilla saatu väriaine vaikuttaisi tutkimuksen perusteella niin voimakkaalta, että hyviin kivennäisveden värjäystuloksiin riittäisi vähempikin määrä marjaa. Referenssiin verraten kefiirifermentoitua väriainetta tarvitsi laittaa alle kolmannes, jolloin voitaneen olettaa että yksi kolmasosa käytetystä marjamäärästä voisi olla riittävä hyvälaatuiseen väriaineeseen. Tutkimuksessa käytetyn marjamäärän käyttöä voidaan kuitenkin tukea oletuksella, että väriainetta tutkimuksen kaltaisilla määrillä, tarvitsee laittaa vähemmän kuin laimeammalla väriaine sovelluksella. Tämä voinee vähentää tuotteessa mahdollisesti esiintyviä makuvirheitä, joita variksenmarjasta voinee tuotteeseen tulla. Makuprofiilin muutosta työssä ei ole tutkittu, joten tutkimuspohjaa makuprofiilin vaikutuksesta tuotteeseen ei ole.

Mielestäni kefiirifermentointi on hyvin kiinnostava sovellus jonka uskoisi toimivan hyvin myös teollisuuskäytössä. Fermentointi oli tutkimuksessa yksinkertainen ja helppo sovellus, jota pystyttäisiin hyödyntämään myös teollisuuskäytössä. Sopivassa lämpötilassa fermentointi tapahtuu kolmessa vuorokaudessa.

Kefiirifermentoinnilla saatu väriaine vaikuttaisi tutkimuksen mukaan myös stabiilimmalta kuin vesiliuotuksella saadut väriaineet. Kivennäisvettä värjätessä kefiirifermentoinnilla saatu väriaine oli vahvempi kuin murskatuista- tai kokonaisista marjoista saadut väriaineet. Myös valokokeen ja varsinkin pimeäsäilytyksen osalta kefiirinäytteiden stabiliteetti vaikutti huomattavasti paremmalta, ja kefiirinäytteet olivat myös värisäilyvyydeltään parempia kuin referenssinäytteet. Viiden kuukauden pimeäsäilytyksessä minisentrifugiputkissa olleet kefiirinäytteet säilyttivät punaisen värinsä huomattavasti paremmin kuin lähes värittömiksi muuttuneet referenssit. Kefiirinäytteiden väri oli silmämääräisesti hieman oranssimpi, mutta väri oli kuitenkin säilynyt.

5.3 Kiinnostavat ja suositeltavat lisätutkimukset

Värin säilyvyyttä tulisi tutkia erityyppisissä varastoinneissa tutkien valon, lämpötilan ja säilytysajan vaikutusta väriaineeseen. Varsinkin kefiirifermentoinnilla saadun väriaineen jatkotutkimukset olisivat hyvin mielenkiintoisia. Myös kemialliset analyysit näille näytteille olisivat mielenkiintoisia ja voisivat selittää työssä saatuja

tuloksia. Tulevissa tutkimuksissa olisi hyvä käyttää happamempia puskureita niin, että saataisiin tutkittua värin käyttäytymistä pH 1–pH 3 välillä, jolloin stabiliteetin pitäisi antosyaaneilla olla parhaimmillaan.

Jäätelön värjäystä olisi ollut mielenkiintoista kokeilla, sillä pakasteissa ei ainakaan valo pääse haalistamaan väriä. Tosin meijerituotteissa pH on usein melko korkea, joten variksenmarjan antosyaanit saattavat jäätelötuotteissa muuttua sinisen tai violetin sävyiseksi.

Myös variksenmarjaa kuivattuna, tai jauhattuna voitaisiin hyödyntää terveysvaikutteisissa elintarvikkeissa. Myös kuivatut väriaineet ovat teollisuudessa käytössä, ja kuivattu variksenmarja väriainekin voisi olla mielenkiintoinen sovellutus, sillä kuiva-aineessa väripitoisuus väriainemäärää kohden on huomattavasti korkeampi kuin työssä käytetyissä mehustepohjaisissa väreissä. Jauhemaisten kuivattujen antosyaanien värin stabiilisuutta tutkittiin Ibrahimin (2011) tutkimuksessa, ja todettiin jauhemaisen antosyaanin olevan stabiilimpi kuin mehumaisen. Tutkimuksessa myös todetaan jauhemaisen antosyaanin voivan toimia hyvin elintarvikepakkausten pH-indikaattoreina.

Myös antosyaanien kopigmentointia on alettu tutkimaan, ja sitä voitaisiin myös variksenmarjan antosyaanien kohdalla tutkia lisää. Kopigmentaation ideana on lisätä värillisen antosyaanin kanssa vuorovaikutteinen antosyaani tai orgaaninen yhdiste, joka aiheuttaa antosyaanin värille vahvemman stabiliteetin muuttamatta väriä.

6 Virhearviot ja -menetelmät

Kokonaisenkauran ja marjamurskan *Rhizopus oligosporus* -fermentointinäytteessä olisi saanut luultavasti olla enemmän nestettä, sillä tutkimuksessa ei tästä erästä saatu mehua ollenkaan tutkittavaksi. Mahdollista on että R.O. muodosti niin paljon rihmastoa että se sitoi nesteen sisään. Luultavasti väriaine ei olisi eronnut paljoa onnistuneesta kaurahiutale-marjamurska fermentoinnissa saaduista näytteistä, mutta mikäli tutkimus toistetaan, pitäisi näytteessä mahdollisesti olla enemmän nestettä.

Myös Kaurahiutaleella tehdyssä sieni fermentoinnissa olisi luultavasti kannattanut olla hieman vähemmän kaurahiutaletta, sillä näytteet turposivat todella paljon. Kaurahiutaleet myös sitoivat vettä, ja haittasivat suodatusta, sillä liika puuromaisuus ehti mehua suodattumasta kunnolla. Kaurahiutalepohjaisessa fermentoinnissa olisi myös hyvä miettiä vaihtoehtoja suodatustapaa, sillä puuromainen massa jäi kiinni suodatinpaperiin, jolloin neste ei meinannut päästä läpi ollenkaan. Puuro-massaa tuli sekoitella koko suodatuksen ajan.

Spektrofotometrillä otetuissa absorbanssi arvoissa sekä Vernier-laitteistolla otetuissa spektreissä oli eroavaisuuksia arvoissa. Absorbanssi näyttivät valokokeessa nousevan aallonpituudella 520nm, mutta spektreissä ei 520nm aallonpituudella ollut enää huippukohtaa. Uskoisin tämän selittyvän näytteiden hyytelöitymisellä sekä nesteen haihtumisella. Valokokeen aikana kannellisista minisentrifugiputkista ei tullut aina täyttä kyvetillistä, vaikka ennen valokoetta saatiin koko kyvetillinen näytettä. Osa näytteistä hieman hyytelöityi valokokeen aikana, jolloin absorbanssi mittaukseen ei saatu kaadettua hyytelöitynyttä osaa kyvetiin. Hyytelöitymisen voi selittää variksen marjan pektiinipitoisuus, pektiinin tunnetusti aiheuttaessa hyytelöitymistä. Valokokeen aikana minisentrifugiputkissa olevat näytteet ”hikoilivat” sisäpuolelta, joten näytteistä on saattanut haihtua hieman nestettä, mutta varmuutta haihtumisesta ei ole. Absorbanssi-arvojen nousu kuvaa väri-intensiteetin kasvua, jolloin loogista on, että nesteen vähentyessä väri-intensiteetti nousee.

Spektrofotometrin mittaustuloksiin vaikuttavat myös mahdolliset kemialliset muutokset näytteestä tai laitteen instrumentaaliset tekijät. Kemiallisia virheitä

voivat olla muun muassa liian suuri tai pieni konsentraatti näytteessä, näytteen eri ainesosien reagoiminen keskenään, liuoksen epätasaisuus, näytteen hajoaminen tai näytteen ionisoituminen. Myös hapen on huomattu vaikuttavan antosyaanien pH:ta nostattavasti, jolloin värisävy voi muuttua ja stabiliteetti heikentyä. Kemiaallisten virhelähteiden mahdollisuutta ei voida pois sulkea. Myös laitteessa on mahdollista olla instrumentaalisia vikoja, mutta niistä ei ainakaan spektrofotometrin käyttäjät ole raportoineet, joten näiden virhelähteiden mahdollisuus on vähäinen. Virhelähteitä on näytteenotossa minimalisoitu varmistamalla, ettei näyte ole samea tai kupliva sekä, että kyvettien täyttö on ollut ohjeen mukainen.

Absorboinnin kasvuun on voinut myös mahdollisesti vaikuttaa liuoksen pH muutokset. Sirkiä (2013,13) mainitsee liuoksen pH:n vaikuttavan absorbanssin kasvuun sekä huomauttaa absorbanssin kasvun olevan voimakkaampaa heikosti happamissa liuoksissa kuin happamammissa liuoksissa.

Vernier-laitteistolla otettujen spektrien eroavaisuus spektrofotometrin absorbanssiarvoon voinee johtua siitä, että spektrofotometrin lamppu käyttää UV/VIS valoa. 2012 vuonna tehdyssä Kiinalaistutkimuksessa (Ma 2012) on tutkittu palsamiköynnöksestä eristettyjen antosyaanien stabiilisuutta, ja huomattu antosyaanien hajontaa UVC, UVB ja UVA valossa. Luultavaa kuitenkin on, ettei spektrofotometrin lyhyen valotuksen pitäisi aiheuttaa antosyaanien tuhoutumista, joten eroavaisuuksille ei ole tiedossa selvää syytä.

LÄHTEET

- Eiro, M., Hopia, A., Kaukovirta-Norja, A., Lehtinen, P. & Heinonen, M., 2000. Enhancing the colour of blackcurrant wine by natural additives. *Vitic. Enol. Sci.* 55, 3–6.
- Eiro, M. & Heinonen, M., 2002. Anthocyanin colour behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50 (25), 7461–7466.
- Evira., 11.5.2017. Elintarvikkeiden lisäaineet. [verkkosivu]. [Viitattu 8.5.2017]
 Saatavana: <https://www.evira.fi/elintarvikkeet/tietoa-elintarvikkeista/koostumus/elintarvikeparanteet/lisaaaineet/e-koodit/>
- Francis, F.J., 1999. Eagan press handbook series: Colorants.
 US: Eagan press.
- Heinonen, M., Meyer, A. & Frankel, E., 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of agricultural and food Chemistry*. 46 (10), 4107–4112.
- Hendry, G.A.F. & Houghton, J.D., 1996. Natural food colorants: second edition.
 London: Chapman & Hall.
- Ibrahim, U., Muhammad, I. & Salleh, R., 2011. The effect of pH on Color Behavior of *Brassica oleracea* Anthocyanin. [Verkkojulkaisu]. Science alert: Research Article. [Viitattu 10.5.2017]. Saatavana: <http://scialert.net/fulltext/?doi=jas.2011.2406.2410&org=11>
- Jiang, J., Paterson, A. & Piggot, J., 1990. *International Journal of Food science and technology* 25, 596–600.
- Jurikova, T., Mlcek, J., Skrovankova, S., Balla, S., Sochor, J., Baron, M. & Sumczynski, D., 2016. Black Crowberry (*Empetrum nigrum* L.) Flavonoids and Their Health Promoting Activity. [Verkkojulkaisu]. *Molecules* 21(12). [Viitattu 8.5.2017]. Saatavana: <http://www.mdpi.com/1420-3049/21/12/1685/htm>
- Kallio, H., Pallasaho, S., Kärppä, J. & Linko, R., 1986. Comparison of the half-lives of the anthocyanins in the juice of crowberry, *Empetrum nigrum*. *Journal of food science: A publication of the institute of food technologists*. 51 (2), 408–410.
- Kim, K., Kim, D., Kim, S., Jung, E., Park, D. & Hyun, J., 2013. *Empetrum nigrum* var. *japonicum* extract suppresses ultraviolet B-induced cell damage via absorption of radiation and inhibition of oxidative stress [Verkkolähde]. Evidence-

- based complementary and alternative medicine. [Viitattu 8.5.2017]. Saatavana: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/983609/>
- Kim, K., Lee, I., Kang, K., Kim, B., Kim, D., Moon, J., Yoo, B. & Hyun, J., 2011. *Empetrum nigrum* var. *japonicum* extract suppresses γ -ray radiation-induced cell damage via inhibition of oxidative stress. [Verkkojulkaisu]. The American journal of Chinese medicine 39 (01). [Viitattu 8.5.2017]. Saatavana World scientific-tietokannasta. Vaatii käyttöoikeuden.
- Laaksonen, O., Sandell, M., Järvinen, R. & Kallio, H., 2010. Orosensory contributing compounds in crowberry (*Empetrum nigrum*) press-byproducts. Food chemistry 124 (4), 1514-1524.
- Ma, C., Yang, L., Yang, F., Wang, W., Zhao, C. & Zu, Y., 2012. Content and color stability of anthocyanins isolated from *schisandra chinensis* fruit. Molecular Sciences 13 (11), 14294–14310.
- Mattila, P., Piironen, V. & Ollilainen, V., 2001. Elintarvikekemian ja -analytiikka. Helsinki: Yliopistopaino.
- Paakki, M., 2014. Värit ohjaavat valintoja ruokalautasella. [Verkkojulkaisu] Ilkka verkkoartikkeli [Viitattu 11.5.2017]. Saatavana: <https://www.ilkka.fi/mielipide/yleis%C3%B6lt%C3%A4/v%C3%A4rit-ohjaavat-valintoja-ruokalautasella-1.1535777>
- Piippo, S., 2010. Suomalaiset Marjat; Kaikki metsän ja puutarhan lajit. Hämeenlinna: Kariston kirjapaino OY.
- Puupponen- Pimiä, R., 2016. Marjoissa piilevä hyödyntämätön potentiaali. [Verkkojulkaisu]. Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy. [Viitattu 8.5.2017]. Saatavana: <http://www.arktisetaromit.fi/binary/file/-/id/137/fid/3177/>
- Rein, M. & Heinonen, M., 2004. Stability and enhancement of berry juice colour. Journal of agricultural and food chemistry 52 (10), 3106–3114.
- Sirkiä, T., 2013. Antosyaanit pH-indikaattoreina. [Verkkojulkaisu]. Helsinki: Helsingin yliopisto. Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta, kemian opettajankoulutus. Kandidaatintutkielma. [Viitattu 10.5.2017]. Saatavana: <http://docplayer.fi/31179537-Antosyaanit-ph-indikaattoreina.html> 4–13
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T. & Sochor, J., 2015. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. International journal of molecular sciences 16 (10), 24673–24706.
- Törrönen, R., McDougall, G., Dobson, G., Stewart, D., Hellström, J., Mattila, P., Pihlava, J-M., Koskela, A. & Karjalainen, R., 2012. Fortification of blackcurrant juice with crowberry: Impact on polyphenol composition, urinary phenolic me-

tabolites, and postprandial glycemic response in healthy subjects. *Journal of functional foods*. 4 (4) 746–756.

Viljanen, K., Heiniö, R-L., Juvonen, R., Kössö, T. & Puupponen-Pimiä, R., 2014. Relation of sensory perception with chemical composition of bioprocessed lingonberry. [Verkkajulkaisu]. National center for biotechnology information. [Viitattu 9.5.2017]. Saatavana PubMed-tietokannasta. Vaatii käyttöoikeuden.

LIITTEET

Liite 1. Kefiirin valmistusohje

LIITE 1 Kefiirin valmistusohje

Kefiirin ohje

Heräteltiin jääkaapissa säilytetyt kefiirit lisäämällä kefiirinsiemenet ravintoliuokseen. Tehtiin kahteen suureen lasipurkkiin kahden litran annokset kefiirin ravintolientä.

Resepti:

2l vettä

8tl kefiirinsiemeniä

2-3 sitruunaviipaletta (hyvin pestynä sekä pilkottuna)

1 dl rusinoita

n1dl sokeria

inkivääriä

(ruoka soodaa)

Kefiirinsiemenet saivat heräillä kannella peitettynä huoneenlämmössä kolme päivää. Kefiiripurkeista mitattiin alkoholipitoisuus toisena päivänä, jolloin todettiin käymistä tapahtuneen. Kefiiriliemestä poistettiin reikäkauhan avulla sitruunat, rusinat sekä inkiväärit. Lientä käytettiin töissä ja kefiirinsiemenet erotettiin liemestä ja huuhdottiin siivilässä. Huuhdotut kefiirin siemenet laitettiin muovirasioihin, 8tl kefiirinsiemeniä, vettä sekä 1tl sokeria. Kefiirinsiemenet laitettiin jääkaappiin odottamaan seuraavaa kasvatuserää.